

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

□ 2.

4/34/2 (Item 2 from file: 347) 04381388 PEPTIDE OR ITS SALT

Pub. No.: 06-025288 [ JP 6025288 A ] Published: February 01, 1994 (19940201)

Inventor: TANIHARA MASAO

**FUJIWARA CHIE** 

Applicant: KURARAY CO LTD [000108] (A Japanese Company or

Corporation), JP (Japan)

Application No.: 04-207501 [JP 92207501]

Filed: July 10, 1992 (19920710).

International Class: [ 5 ] C07K-007/08; C07K-007/06; C07K-007/10; A61K-037/02; A61K-037/02; A61K-037/02; A61K-

037/02; C07K-099/00

JAPIO Class: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4

(ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)

Journal: Section: C, Section No. 1196, Vol. 18, No. 236, Pg. 91, May 06,

1994 (19940506)

### **ABSTRACT**

PURPOSE: To obtain a peptide, useful for treating fracture, wound, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, periodontosis, etc., and capable of effectively suppressing the rejection after organ transplantation.

CONSTITUTION: This peptide or its salt has the following general formula: H- X.up arrow.1-Ala-X.up arrow.2-Pro-Cys-Cys-Val-X.up arrow.3-Gln-X.up arrow.4-Leu-Glu-X.up arrow.5-Y (X.up arrow.2 denotes an amino acid residue selected from the group consisting of Ser and Ala; X.up arrow.3 denotes an amino acid residue selected from the group consisting of Ser and Pro; X.up arrow.4 denotes an amino acid residue selected from the group consisting of Ala and Asp; X.up arrow.1 and X.up arrow.5 respectively denote single bonds or peptide fragments composed of 1-5 amino acid residues selected from the group consisting of Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle and Ile; Y

denotes hydroxyl group or amino group) and transforming growth factor (TGF)-.beta.-like activity.

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2003 JPO & JAPIO. All rights reserved.

```
11636776
Basic Patent (No,Kind,Date): JP 6025288 A2 940201

PATENT FAMILY:
JAPAN (JP)
Patent (No,Kind,Date): JP 6025288 A2 940201

PEPTIDE OR ITS SALT (English)
Patent Assignee: KURARAY CO
Author (Inventor): TANIHARA MASAO; FUJIWARA CHIE
Priority (No,Kind,Date): JP 92207501 A 920710
Applic (No,Kind,Date): JP 92207501 A 920710
IPC: * C07K-007/08; C07K-007/06; C07K-007/10; A61K-037/02; C07K-099-00
CA Abstract No: ; 121(01)000894M
Derwent WPI Acc No: ; C 94-077373
... JAPIO Reference No: ; 180236c000091
Language of Document: Japanese
```

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2003 EPO. All rights reserved.

select (alls none	Records	1-3	of	3	In long Format	
Output 🚱	For	<sub>mat:</sub> Lon	g		Output as: Browser	display/send
Modify 😌					refine search	back to picklist

©1997-2003 The Dialog Corporation - Version 2.3

# (19)日本国特許庁 (JP) (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

# 特開平6-25288

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>		識別記号	庁内整理番号	FI				技術表示箇所
C 0 7 K	7/08	ZNA	7537-4H					
	7/06	Z	8318-4H					
	7/10		7537-4H					
// A 6 1 K	37/02	ABG						
		ABJ						
				審査請求	未請求	請求項の数3(全	9 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号

特願平4-207501

(22)出顧日

平成 4年(1992) 7月10日

(71)出願人 000001085

株式会社クラレ

岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)発明者 谷原 正夫

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社

クラレ内

(72)発明者 藤原 千絵

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社

クラレ内

# (54)【発明の名称】 ペプチドまたはその塩

#### (57)【要約】

【構成】 下記の一般式

 $H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3 Gln - X \uparrow 4 - Leu - Glu - X \uparrow 5 - Y$ 

(式中、X↑2 は Serおよび Alaよりなる群から選ばれ るアミノ酸残基を表し、X↑3 は Serおよび Proよりな る群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4は Alaお よび Aspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、  $X \uparrow 1$  および $X \uparrow 5$  はそれぞれ単結合または Gly、 Al a, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Gl u、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nleおよび Ileよ りなる群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基よりなる ペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表 す)で示され、かつTGF-β様活性を有するペプチド またはその塩。

【効果】 骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節 炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有用 であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制す る。

#### 【特許請求の範囲】

#### 【請求項1】 一般式

 $H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3 Gln - X \uparrow 4 - Leu - Glu - X \uparrow 5 - Y$ 

(式中、X↑2 は Serおよび Alaよりなる群から選ばれ るアミノ酸残基を表し、X ↑3 は Serおよび Proよりな る群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4 はAlaお よび Aspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 X↑1 およびX↑5 はそれぞれ単結合または Gly、 Al a. Val. Arg. Asn. Ser. Phe. Pro. Leu. Glu. Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nleおよび Heよりな る群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基よりなるペプ チド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す。) で示され、かつ $TGF - \beta$ 様活性を有するペプチドまた はその塩。

#### 【請求項2】 一般式

#### $H-X \uparrow 6-A-X \uparrow 7-Y$

(式中、Aは式(1): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1) で示されるペプチド 断片、式(2): Ala Ser Pro Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (配列番号:2)で示されるペプチド断片ま たは式(3): Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号:3)で示されるペプチド断片を表 し、X↑6 およびX↑7 はそれぞれ単結合または Gly、 Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, G lu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nleおよび Ileよ りなる群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基からなる ペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表 す。) で示される請求項1記載のペプチドまたはその 塩。

#### 【請求項3】 下記の

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)。

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号:5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式(7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号:7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列 番号:8)または

式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列 番号:9)

で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

#### 【発明の詳細な説明】

#### [0001]

【産業上の利用分野】本発明はTGF-β様活性を有す

れるペプチドまたはその塩は、TGF-β様活性を有す ることから、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関 節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有 用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制す ることができる。

2

#### [0002]

【従来の技術】TGF(トランスフォーミング グロウ は、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的性質を発現させる腫瘍由来 10 因子として発見され、その後、血小板、マクロファー ジ、骨、腎臓などの正常組織にも発見された(臨床免 疫、第24巻、第 146頁 (1992年)参照)。活性型のTG F-βは分子量が約25kDのホモダイマーとして存在 し(プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカ デミー オブ サイエンシーズオブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、第85巻、第4715頁(1988年)参照)、ラットの正 常線維芽細胞であるNRK-49F株に対して可逆的に 形質転換を引き起こし、軟寒天培地での増殖を促進する 作用を有するが、その他多くの細胞に対しては増殖抑制 因子として作用することが明らかになっている(カレン ト トピックス イン ディベロップメンタル バイオ ロジー (Current Topics in Developmental Biology) 第24巻、第95頁 (1990年)参照)。

【0003】TGF-etaは血管の新生を促進し、かつ細 胞外基質蛋白質の合成を促進することから、骨折の接合 作用または創傷治癒効果を有すると考えられる(サイエ ンス(Science)、第 237巻、第1333頁 (1987年)参照)。 また、TGF-βは強力な免疫抑制作用をもつことか 30 ら、臓器移植後の拒絶反応を抑制することが報告されて いる (プロシーディングス オブ ザ ナショナル ア カデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ ユナイテ ッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、第87巻、第1591頁 (1990年)参照)。さら に、TGF-βはリウマチ性関節炎の患者の関節液中に 存在し、強力な炎症性メディエータであるIL-1の作 用を中和することが報告されている(ザージャーナル) オブ イムノロジー (J. Immunol.)、第 145巻、第2514 頁 (1990年)参照)。また、TGF-βは in vivo で 骨形成を促進することから、骨粗鬆症または歯周炎の治 療に有用であると考えられ(実験医学、第8巻、第345 頁(1990年)参照)、実験的多発性硬化症モデル動物の 発症を抑制することも報告されている (プロシーディン グス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイ エンシーズ オブザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、第88巻、第 2918頁 (1991年)参照)。

#### [0004]

【発明が解決しようとする課題】上記のTGF-Bは、 るペプチドまたはその塩に関する。本発明により提供さ 50 分子量が大きいことから免疫原性が高く、反復投与によ

りアナフィラキシーショックを引き起こす虞れがある。 また生体内に投与しても数分内に血中から消失し、有効 性が失われる。また大量に投与することにより、肝臓お よび腎臓に対する毒性、非特異的な免疫抑制などの種々 の副作用が発現する可能性がある。しかるに、本発明の 目的は、TGF-βよりも副作用が少なく、かつ強いT\* \* G F - β 様活性を有するペプチドを提供することにある。

[0005]

【課題を解決するための手段】本発明によれば、上記の 目的は、下記の一般式(I)

 $H-X\uparrow 1$  -Ala  $-X\uparrow 2$  -Pro -Cys -Cys -Val  $-X\uparrow 3$  -Gln  $-X\uparrow 4$  -Leu -Glu  $-X\uparrow 5$  -Y (I)

(式中、X↑2 は Serおよび Alaよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3 は Serおよび Proよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4は Alaおよび Aspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1 およびX↑5 はそれぞれ単結合または Gly、 Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、 Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nleおよび Ileよりなる群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示されるペプチドまたはその塩を提供することによって達成される。

【0006】本明細書においては各種アミノ酸残基を次 20 の略号で記述する。

Ala: L-アラニン残基

Arg : L-アルギニン残基

Asn: L-アスパラギン残基

Asp : L-アスパラギン酸残基

Cys : Lーシステイン残基

Gln: Lーグルタミン残基

Glu: L-グルタミン酸残基

Gly : グリシン残基

His: Lーヒスチジン残基

Ile: L-イソロイシン残基

Leu : L-ロイシン残基

Lys : L-リシン残基

Phe: L-フェニルアラニン残基

Pro : Lープロリン残基

Ser: L-セリン残基

Thr: L-トレオニン残基

Trp : L-トリプトファン残基

Tyr : L-チロシン残基

Val : Lーバリン残基

Nle : L-ノルロイシン残基

また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

【0007】上記一般式(I)で示されるペプチドのうち、下記一般式(II)

 $H-X \uparrow 6 -A-X \uparrow 7 -Y$  (II)

(式中、Aは式(1): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro タンパク質の化学(下)」、第 641-694頁(明 Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1)で示されるペプチド※50 5月20日 株式会社東京化学同人発行)参照)。

※断片、式(2): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln As 10 p Leu Glu (配列番号: 2) で示されるペプチド断片または式(3): Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3) で示されるペプチド断片を表し、X↑6 およびX↑7 はそれぞれ単結合または Gly、

Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nleおよび Ileよりなる群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示されるペプチドが好ましい。

【0008】本発明により提供されるペプチドの代表例を次に示す。

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)

式 (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号:6)、

式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys 30 Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列 番号: 8) および

式 (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro lle Leu (配列番号: 9)。

【0009】本発明のペプチドの塩は生理学的に許容される塩であり、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマール酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩;ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩との塩;トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、tーブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

【0010】本発明のペプチドは、ペプチドの合成において通常用いられる方法、例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である(例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2タンパク質の化学(下)」、第641-694頁(昭和62年5月20日 株式会社東京化学同人発行)参照)。

4

【0011】本発明のペプチドの固相合成法による調製 は、例えば、スチレンージビニルベンゼン共重合体など の反応溶媒に不溶性である重合体に目的とするペプチド のC末端に対応するアミノ酸をそれが有するα-COO H基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とする ペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸 またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が 有するα-CΟΟΗ基以外のα-アミノ基などの官能基 を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合 したアミノ酸またはペプチド断片におけるα-アミノ基 10 などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基 を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド 鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド 鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離さ せ、かつ保護されている官能基から保護基を除去するこ とにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製す ることによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合 体からの脱離および保護基の除去は、フッ化水素を用い て同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。 また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラ 20 フィーで行うのが効果的である。

【0012】また、本発明のペプチドの塩は、通常の塩 生成反応を利用することにより調製される。

【0013】後述の試験例から明らかなとおり、本発明のペプチドおよびその塩(以下、これらをペプチド類と略称する)は、TGF-β様活性を有し、かつ毒性試験において低毒性であることが確認されている。

【0014】以上の結果から、本発明のペプチド類は骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用である。ま 30た、本発明のペプチド類は、臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

【0015】本発明のペプチド類は、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの患者に投与することにより、上記罹患者の症状を軽減することができる。

【0016】ペプチド類の有効な活性発現のための投与 量は、疾病、患者の重篤度、薬物に対する忍容性などに より異なるが、通常成人1日当たり、 $0.01\mu$ g/kg $\sim$ 2g/kgであり、好ましくは $0.01\mu$ g/kg $\sim$ 20 0mg/kgである。

【0017】投与形態としてはペプチド類を5%ブドウ糖液や生理食塩水などの生理学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理学的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。

【0018】投与方法としては静脈投与、皮下投与、腹腔投与、関節内投与、経皮投与などが挙げられ、さらにペプチド類をカプセル化またはリボソーム化することにより経口投与も可能である。

[0019]

6

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0020】実施例1

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala LeuGlu (配列番号: 4)で示される ペプチドをペプチド自動合成装置を用いて固相合成法に より合成した。すなわち、4-[N-(t-ブトキシカ ルボニル)ーァーベンジルーLーグルタミルオキシメチ ル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモ ル/g(樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベン ゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル 比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バ イオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-G1 u(OBz1) 〕 O. 1ミリモルを用い、ペプチドのN端に向 かって順次アミノ酸を結合させた。結合反応において、 アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社 **製のN↑α−(t−ブトキシカルボニル)−L−グルタ** ミン〔t-Boc グルタミン〕、Nー(tーブトキシカルボ ニル)ーLーロイシン〔t-Boc ロイシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-プロリン〔t-Boc プロリ ン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-グリシン 〔t-Boc グリシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル) -L-アスパラギン〔t-Boc アスパラギン〕、N-(t ーブトキシカルボニル) - O - ベンジルーレーセリン 〔t-Boc セリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-S-(p-メトキシベンジル)-L-システイン[t-Bo c システイン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L ーバリン〔t-Boc バリン〕、Nー(tーブトキシカルボ ニル)ーLーアラニン〔t-Boc アラニン〕をそれぞれ1 ミリモル用いた。

【0021】得られたペプチドについて株式会社ペプチド研究所製のHF反応装置I型を用いて脱保護と固相からの脱離を行った。粗生成物をミリボア・ウォーターズ社製分取用高速液体クロマトグラフ〔カラム:デルタパックC18 47×300mmプレップパック1000加圧モジュール付〕で精製した。得られた精製ペプチドを島津製作所株式会社製LC6A分析用高速液体クロマトグラフ〔カラム:東ソー株式会社製TSKgel ODS-80TM CTR、移動相:トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に変化させた)〕に付したところ、18.8min に単一のピークが示された。FAB法マススペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1527であった(理論値:1527.72)。

【0022】実施例2~6および比較例1

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro IleVal (配列番号: 5)で示される 50 ペプチド(実施例2)、式(6): Ala Pro Glu Ala Se

r Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号:6)で示されるペプチド(実施例3)、式(7):Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号:7)で示されるペプチド(実施例4)、式(8):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号:8)で示されるペプチド(実施例5)、式(9):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu Pro I le Leu (配列番号:9)で示されるペプチド(実施例6)、および式(10):Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Tr p Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号:10)で示されるペプチド(比較例1)を実施例1と同様の方法により合成した。

【0023】実施例2および実施例4では4-(N-(t-ブトキシカルボニル)-L-バリルオキシメチ ル〕 - フェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモ ル/g(樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベン ゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル 比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バ 20 イオシステムズ社製、PAMバリン、t-Boc-L-Val ) 0.1ミリモルを用い、実施例3では4-[N-(t-ブトキシカルボニル) - アーベンジルーLーグルタミル オキシメチル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0. 70ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレンージ ビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼン の構成モル比: 99対1]からなる粒状樹脂〔米国アプ ライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、 t-Boc-L-Glu(OBz1) 〕 O. 1ミリモルを用い、実施例5 及び実施例6では4-[N-(t-ブトキシカルボニ ル) - L - ロイシルオキシメチル] - フェニルアセトア ミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂)の割合で

8

有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMロイシン、t-Boc-L-Leu〕0.1ミリモルを用い、比較例1では4-〔N-(t-ブトキシカルボニル)-〇・ベンジルーLーセリルオキシメチル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0.72ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMセリン、t-Boc-L-Ser(Bz1)〕0.1ミリモルを用いた。

【0024】また、アミノ酸としては、実施例1で用いたものに加えて米国アプライド・バイオシステムズ社製の $N-(t-ブトキシカルボニル)-O-(2-ブロモベンジルオキシカルボニル)-L-チロシン〔t-Boc チロシン〕、<math>N-(t-ブトキシカルボニル)-L-イソロイシン〔t-Boc イソロイシン〕、<math>N-(t-ブトキシカルボニル)-r-ベンジル-L-グルタミン酸〔t-Boc グルタミン酸〕、<math>N-(t-ブトキシカルボニル)-\beta-ベンジル-L-アスパラギン酸〔t-Boc アスパラギン酸〕、<math>N\uparrow\alpha-(t-ブトキシカルボニル)-NInd-ホルミル-L-トリプトファン〔t-Boc トリプトファン〕を用いた。$ 

【0025】得られたそれぞれのペプチドについて実施例1におけると同様にして脱保護と固相からの脱離を行い、粗生成物を精製した。それぞれの精製ペプチドについて、分析用高速液体クロマトグラフにおける溶出時間およびFAB法マススペクトルによる分子量測定結果を第1表にまとめて示す。

[0026]

【表1】

実施例 溶出時間		精製べ	<b>・プチド</b>			
または	(min)	式番号	分子量	(理論値)		
		八田勺	)) [ SE			
実施例2	23.9	(5)	1620	1620.97		
実施例3	18.0	(6)	1658	1659.79		
実施例4	23.8	(7)	1680	1680.98		
実施例 5	25.5	(8)	2112	2115.38		
実施例6	2.5.0	(9)	2111	2111.39		
比較例1	23.4	(10)	1631	1629.78		

# 【0027】試験例1

コンカナバリンA刺激マウス脾臓細胞の増殖抑制試験 BALB/cマウス脾臓細胞を、コンカナバリンA:3μ8/៤、2ーメルカプトエタノール:50μM、牛胎児血清:13%の割合でそれぞれ含有するRPMI-1640培地に分散し、5000個/ウエルの割合で96ウエルプレートに分注し、7%CO↓2存在下37℃で7日間培養した。培養後プロピディウムアイオダイドで生細胞のDNAを標識し、蛍光強度を測定することによ\*

\* り生細胞数をカウントした。ペプチドは100μg/m 1、TGF-βは1ng/mlの濃度になるようにそれぞれコンカナバリンA刺激直前に添加した。コンカナバリンAを加えないウエルに対するコンカナバリンAのみを加えたウエルの生細胞数の増加を1として、ペプチドまたはTGF-βを加えた時の生細胞数の減少を抑制率として表した。結果を第2表に示す。

【0028】 【表2】

第 2 表

実施例または	ペプチド	抑制率 (%)
-	т G F — В	8 5
実施例 1	式(4)で表されるペプチド	6 0
実施例2	式(5)で表されるペプチド	7 0
実施例3	式(6)で表されるペプチド	6 5
実施例4	式(7)で表されるペプチド	7 3
実施例5	式 (8) で表されるペプチド	7 0
実施例 6	式(9)で表されるペプチド	7 2
比較例1	式(10)で表されるペプチド	2

【0029】第2表のとおり、 $TGF-\beta$ の抑制率が85%であるのに対して、実施例1~実施例6で得られたペプチドの抑制率は60%~73%であり、本発明のペプチドが $TGF-\beta$ 様の活性を示すことは明らかである。

#### 【0030】試験例2

#### 軟寒天中のコロニー形成試験

2.5 ng/mlのEGF、10%の牛胎児血清及び0.5% 30 の寒天を含むイーグルのMEM培地にNRK-49F細胞を1000個/シャーレの割合で直径10cmのシャーレに撒き、7%CO↓2存在下37℃で7日間培養した。ニュートラルレッドで生細胞を染色し、コロニー100個あたりの70μm以上の直径を有するコロニーの割合を求めた。その結果、実施例1で得られたペプチドを300μg/mlの濃度で添加したときに平均58%のコロニーが形成され、何も添加しないコントロールの平均33%と比較して有意にコロニー形成が促進された。【0031】

【0032】 【配列表】

配列番号:1 配列の長さ:11 配列の型:アミノ酸 \*トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu 1 5 10

【0033】配列番号:2

配列の長さ:11 ) 配列の型:アミノ酸 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Vai Pro Gin Asp Leu Giu 1 5 10

【0034】配列番号:3

配列の長さ:11 配列の型:アミノ酸 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

> Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu 1 5 10

【0035】配列番号:4

配列の長さ:16 配列の型:アミノ酸 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

\* 50

```
13
```

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

【0036】配列番号:5

5

10

14

配列の長さ:16

\*トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val 5

10

15 10※トポロジー:直鎖状

【0037】配列番号:6

配列の種類:ペプチド

配列の長さ:16 配列の型:アミノ酸

配列

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu 5 15

Ж

【0038】配列番号:7

10 ★トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列の長さ:16 配列の型:アミノ酸

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val 5

10

【0039】配列番号:8 配列の長さ:21

☆トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

松

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu 1 10 15

Pro Leu Thr Ile Leu

20

【0040】配列番号:9

30◆トポロジー:直鎖状

配列の長さ:21

配列の型:アミノ酸

配列の種類:ペプチド

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu 10 15

Pro Leu Pro Ile Leu

【0041】配列番号:10

\*トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列の長さ:14

配列の型:アミノ酸

\* 40

配列

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

5

10

フロントページの続き

(51) Int. Cl.5

識別記号

庁内整理番号

FΙ

技術表示箇所

A 6 1 K 37/02

ACK

ADA

8314-4C

ADF

C07K 99:00

•

```
DN
        121:894
        Peptides or their salts having transforming growth factor
   TI
        (TGF) - . beta. - like activity
   IN
        Tanihara, Masao; Fujiwara, Che
        Kuraray Co, Japan
   PA
        Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.
        CODEN: JKXXAF
        Patent
   LA
        Japanese
        ICM C07K007-08
   IC
        ICS - C07K007-06; C07K007-10
   ICA
        A61K037-02
  ICI
        C07K099-00
        1-7 (Pharmacology)
        Section cross-reference(s): 34
   FAN.CNT 1
        PATENT NO.
                          KIND
                               DATE
                                                APPLICATION NO.
                                                                   DATE
                                19940201
        JP 06025288
                           A2
                                                 JP 1992-207501
                                                                   19920710 <--
  PRAI JP 1992-207501
                                19920710
       MARPAT 121:894
        H-X1-Ala-X2-Pro-Cys-Cys-Val-X3-Gln-X4-Leu-Glu-X5-Y [X2 = Ser, Ala; X3 =
       Ser, Pro; X4 = Ala, Asp; X1, X5 = single bond, peptide fragment having 1-5 amino acid residue(s) chosen from Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle, and Ile; Y = OH, NH2], having
        TGF-.beta.-like activity, are useful for treatment of fractures,
       wounds, rheumatoid arthritis, osteoarthritis,
      osteoporosis, periodontitis, multiple sclerosis, etc.
      Asn-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Glu (prepn.
      given) (at 100 .mu.g/mL) inhibited the growth of Con A-stimulated murine
      spleen cells by 60%, vs. 85%, for TGF-.beta..
      peptide transforming growth factor beta like; TGF beta like peptide
      therapeutic; fracture wound treatment peptide prepn; rheumatoid
      arthritis osteoporosis treatment peptide; osteoarthritis
      periodontitis treatment peptide; multiple sclerosis treatment peptide
      Peptides, biological studies
      RL: BIOL (Biological study)
          (TGF-.beta.-like, for therapeutics)
 IT
      Immunosuppressants
      Wound healing promoters
         (peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities as)
 ΤT
      Multiple sclerosis
        Osteoporosis
         (treatment of, peptides having transforming growth factor-.beta.-like
         activities for)
      Inflammation inhibitors
         (antiarthritics, peptides having transforming growth factor-.beta.-like
         activities for)
IT
      Inflammation inhibitors
         (antirheumatics, peptides having transforming growth factor-.beta.-like
         activities for)
IT
      Periodontium
         (disease, periodontitis, treatment of, peptides having transforming
         growth factor-.beta.-like activities for)
TT.
     Bone, disease
         (fracture, treatment of, peptides having transforming growth
         factor-.beta.-like activities for)
IT
     Animal growth regulators
     RL: BIOL (Biological study)
         (.beta.-transforming growth factors, peptides having activities like,
         for therapeutics)
     3978-80-1, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-tyrosine
IT
                                                        4530-20-5
                                                                     7536-55-2.
     N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-asparagine
                                              13139-15-6, N-(tert-Butoxycarbonyl)-
     L-leucine 13139-16-7, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-isoleucine
     13726-67-5, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-aspartic acid
                                                               13726-85-7.
     N.alpha.-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glutamine
                                                     13734-41-3
     N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valine
                                         15761-38-3, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-
               15761-39-4, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-proline
                                                                   18942-46-6,
     N-(tert-Butoxycarbonyl)-S-(p-methoxybenzyl)-L-cysteine
                                                                  23680-31-1,
     N-(tert-Butoxycarbonyl)-O-benzyl-L-serine 47355-10-2
     RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)
         (peptide coupling of)
IT
     155566-20-4P
                     155566-21-5P
                                    155566-22-6P
                                                    155566-23-7P
                                                                     155566-24-8P
     155606-60-3P
     RL: SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation)
         (prepn. and transforming growth factor-.beta.-like activities of)
IT
     47355-10-2
     RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)
     (peptide coupling of)
47355-10-2 HCAPLUS
RN
CN
     L-Tryptophan, N-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-1-formyl- (9CI) (CA INDEX
     NAME)
```

1994:400894 HCAPLOS

AN

JP6-25288-A



# MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

(19)[ISSUING COUNTRY]

日本国特許庁(JP)

Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

(12)[GAZETTE CATEGORY]

公開特許公報(A)

Laid-open Kokai Patent (A)

(11)【公開番号】

(11)[KOKAI NUMBER]

特開平6-25288

Unexamined Japanese Patent (1994-25288)

Heisei 6-25288

(43)【公開日】

(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]

平成6年(1994)2月1日 (1994.2.1)

(54)【発明の名称】

(54)[TITLE of the Invention]

ペプチドまたはその塩

PEPTIDE OR ITS SALT

(51)【国際特許分類第5版】

(51)[IPC Int. Cl. 5]

C07K 7/08

ZNA C07K 7/08 ZNA 7537-4H

7537-4H

7/06

Z 8318-4H

7/06

Z 7/10

7537-4H

8318-4H

// A61K 37/02

ABG

7/10

7537-4H

ABJ

ACK

// A61K 37/02

ABG

ADA 8314-4C

ABJ

ADF

ACK

C07K 99:00

ADA

8314-4C

**ADF** 

C07K 99:00

【審査請求】 未請求 [REQUEST FOR EXAMINATION] No



【請求項の数】 3

[NUMBER OF CLAIMS] 3

【全頁数】 9

[NUMBER OF PAGES] 9

(21)【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特願平4-207501

Japanese Patent Application (1992-207501)

Heisei 4-207501

(22)【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成4年(1992)7月10 (1992.7.10)

日

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

000001085

000001085

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

株式会社クラレ

Kuraray Co., Ltd.

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

谷原 正夫

Tanihara Masao

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津2045番地

の1 株式会社クラレ内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

7/16/2003

2/30

(C) DERWENT



【氏名】

藤原 千絵

[NAME OR APPELLATION]

Fujiwara Chie

【住所又は居所】

岡山県倉敷市酒津2045番地 の1 株式会社クラレ内

[ADDRESS or DOMICILE]

(57)【要約】

(57)[ABSTRACT of the Disclosure]

# 【構成】

下記の一般式

 $-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln \uparrow 4-Leu-Glu-X \uparrow 5-Y$ Y

(式中、X↑2 は Ser および and Ala in the Formula. Ser および Pro よりなる群から 選ばれるアミノ酸残基を表し、 X ↑ 4 は Ala および Asp より はそれぞれ単結合または Gly、 Thr、 His、 Tyr、 れる1~5個のアミノ酸残基よ has a TGF-(beta-) like activity. りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す) で示され、かつ $TGF-\beta$ 様活性を有するペプチドまたは

# [CONSTITUTION]

The following general formula  $H - X \uparrow 1 - Ala - X \uparrow 2 - Pro H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln-X$ 

 $-X \uparrow 4$  Leu  $-Glu - X \uparrow 5$   $-(X \uparrow 2)$ , expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser

Ala よりなる群から選ばれるア X↑3 expresses the amino acid residue chosen ミノ酸残基を表し、X↑3 は from the group which is made of Ser and Pro, x ↑4 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp, x ↑1 and X↑5 express the peptide fragment なる群から選ばれるアミノ酸残 which is made of a 1-5 amino acid residue 基を表し、X↑1 およびX↑5 chosen from the group which is made of a single bond Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Ser、 Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,L Phe Pro Leu Glu Asp ys, Thr, His, Tyr, NIe, and IIe, respectively, y Nle expresses a hydroxyl group or an amino group.) および lle よりなる群から選ば It shows above, and the peptide or its salt which



その塩。

# 【効果】

骨折、創傷、多発性硬化症、リ 骨粗鬆症、歯周病などの治療に 有用であり、また臓器移植後の 拒絶反応を効果的に抑制する。

# 【特許請求の範囲】

# 【請求項1】

一般式

-Cys-Cys-Val-X↑3-Gln↑4-Leu-Glu-X↑5-Y Y

選ばれるアミノ酸残基を表し、 はそれぞれ単結合または Gly、 Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, His, Tyr, Nle および lle よりなる群から選ば has a TGF-(beta-) like activity. れる1~5個のアミノ酸残基よ りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す。) で示され、かつTGF-B

# [ADVANTAGE]

It is useful for the treatment of fracture, a ウマチ性関節炎、変形性関節症、 wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, etc.

> Moreover, the rejection after an organ transplant is suppressed effectively.

# [CLAIMS]

# [CLAIM 1]

General formula

 $H - X \uparrow 1 - Ala - X \uparrow 2 - Pro H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln-X$ 

 $-X \uparrow 4-\text{Leu}-\text{Glu}-X \uparrow 5-$  (X \frac{1}{2}, expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser (式中、X↑2 は Ser および and Ala in the Formula, x↑3 expresses the Ala よりなる群から選ばれるア amino acid residue chosen from the group ミノ酸残基を表し、X↑3 は which is made of Ser and Pro, x↑4 expresses Ser および Pro よりなる群から the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp,  $x \uparrow 1$  and  $X \uparrow 5$ X ↑4 は Ala および Asp より express the peptide fragment which is made of なる群から選ばれるアミノ酸残 a 1-5 amino acid residue chosen from the group 基を表し、X↑1 およびX↑5 which is made of a single bond or Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L ys,Thr,His,Tyr,Nle, and lle, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which



様活性を有するペプチドまたは その塩。

### 【請求項2】

### 一般式

 $H-X \uparrow 6-A-X \uparrow 7-Y$ 

Asp Leu Glu (配列番号: 2) 断片を表し、X ↑6 およびX ↑ Asp、Lys、Thr、His、 Nle および lle よりなる群から group. ) 選ばれる1~5個のアミノ酸残 The peptide or its salt of Claim 1 shown now. 基からなるペプチド断片を表 し、Yは水酸基またはアミノ基 を表す。)で示される請求項1記 載のペプチドまたはその塩。

# 【請求項3】

# 下記の

Ala Leu Glu (配列番号: 4)、 Pro lle Val (配列番号:5)、

# [CLAIM 2]

General formula H-X ↑ 6-A-X ↑ 7-Y

(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro (In the Formula, A is a peptide fragment shown Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Glu (配列番号: 1)で示され Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): るペプチド断片、式 (2): Ala The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Ser Pro Cys Cys Val ProGln Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

で示されるペプチド断片または Or Formula (3): Expressing the peptide 式(3): Ala Ser Pro Cys Cys fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列 Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3), x ↑ 6 番号:3)で示されるペプチド and X↑7 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from 7 はそれぞれ単結合または the group which is made of a single bond or Gly、 Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ser、 Phe、 Pro、 Leu、 Glu、 ys,Thr,His,Tyr,Nle, and lle, respectively, y Tyr, expresses a hydroxyl group or an amino

# [CLAIM 3]

#### Following

式(4):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val 式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp



Leu Pro lle Val (配列番号: 7)、 (sequence number: 8) **Leu** (配列番号:8) または 式(9):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号:9) で示される請求項1記載のペプ チドまたはその塩。

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Asp Leu Glu (配列番号: 6)、 Leu Pro lle Val (sequence number: 7), formula 式(7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Or formula (9): The peptide or its salt of Claim 1 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Asp Leu Glu Pro Leu Thr lle Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro lle Leu (sequence number: 9).

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]

[0001]

[0001]

#### 【産業上の利用分野】

ら、骨折、創傷、リウマチ性関 節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、 歯周病、多発性硬化症などの治 後の拒絶反応を効果的に抑制す ることができる。

# [INDUSTRIAL APPLICATION]

本発明はTGF- $\beta$ 様活性を有 This invention relates to the peptide or its salt するペプチドまたはその塩に関 which has a TGF-(beta-) like activity.

する。本発明により提供される Since the peptide or its salt which this invention ペプチドまたはその塩は、TG provides has a TGF-(beta-) like activity, it is  $F - \beta$  様活性を有することか useful for the treatment of fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc.

Moreover, the rejection after an organ 療に有用であり、また臓器移植 transplant can be suppressed effectively.



[0002]

[0002]

### 【従来の技術】

TGF (トランスフォーミング TGF(transforming グロウス ファクター transforming βは、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的 makes 性質を発現させる腫瘍由来因子 oncocyte-characteristic, (臨床免疫、第 24 巻、第 146 (1992)). ザ ナショナル アカデミー (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.).) 頁 (1988年)参照)、ラットの正 agar. は増殖抑制因子として作用する ことが明らかになっている(カ レント トピックス イン デ イベロップメンタル バイオロ ジー (Current Topics in Developmental Biology)、第24 巻、第 95 頁 (1990 年)参照)。

# [PRIOR ART]

growth factor growth factor)-(beta-) transforming growth factor) - discovered as a tumor origin factor which the non-oncocyte express after that, として発見され、その後、血小 tissues, such as blood platelets, macrophage, a 板、マクロファージ、骨、腎臓 bone, and a kidney, also discovered (refer to a などの正常組織にも発見された clinical immunology, Volume 24, and Page 146

頁 (1992年)参照)。活性型のT As for activated TGF- (beta-), molecular weight  $GF-\beta$  は分子量が約25 k D exists as a homo dimer of about 25 kD(s).

のホモダイマーとして存在し (Proceedings of the National Academy of the (プロシーディングス オブ Sciences of the United States of America

オブ サイエンシーズオブ ザ It causes transforming reversibly to NRK-49F ユナイテッド ステイツ オブ strain which is the normal fibroblast of Volume アメリカ (Proc. Natl. Acad. 85, refer Page 4715 (1988), and a rat, it has the Sci.USA.)、第 85 巻、第 4715 effect which promotes propagation by the soft

常線維芽細胞であるNRK-4 However, it becomes clearly to act as a 9F株に対して可逆的に形質転 growth-inhibition factor to many cell in addition 換を引き起こし、軟寒天培地で to this (refer Current Topics in Developmental の増殖を促進する作用を有する Biology (Current Topics in Developmental が、その他多くの細胞に対して Biology), Volume 24, and Page 95 (1990)).



# [0003]

ミー オブ サイエンシーズ and Page 1591 (1990)). 関節炎の患者の関節液中に存在 し、強力な炎症性メディエータ であるIL-1の作用を中和す ることが報告されている(ザ ー (J. Immunol.)、第 145 巻、 第 2514 頁 (1990 年)参照)。ま た、 $TGF-\beta$ は in vivo で骨 鬆症または歯周炎の治療に有用 であると考えられ(実験医学、 参照)、実験的多発性硬化症モデ ル動物の発症を抑制することも 報告されている(プロシーディ ングス オブ ザ ナショナル

# [0003]

 $TGF-\beta$  は血管の新生を促進 TGF- (beta-) promotes neogenesis of the blood し、かつ細胞外基質蛋白質の合 vessel, and since a synthesis of 成を促進することから、骨折の extra-cellular substrate protein is promoted, it is 接合作用または創傷治癒効果を thought that it has a joining effect of fracture or 有すると考えられる(サイエン the wound healing effect (refer a science ス(Science)、第 237 巻、第 1333 (Science), Volume 237, and Page 1333 (1987)). 頁 (1987年)参照)。また、TG Moreover, since TGF- (beta-) has a forceful  $F - \beta$  は強力な免疫抑制作用を immunosuppressive effect, suppressing the もつことから、臓器移植後の拒 rejection after an organ transplant is reported 絶反応を抑制することが報告さ (refer to the Proceedings of the National れている(プロシーディングス Academy of Sciences of the United States of オブ ザ ナショナル アカデ America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.), Volume 87,

オブ ザ ユナイテッド ステ Furthermore, TGF- (beta-) exists in the synovial イツ オブ アメリカ (Proc. fluid of the patient of a rheumatic arthritis, Natl. Acad. Sci. USA.)、第87巻、 neutralizing an effect of IL-1 which is a forceful 第 1591 頁 (1990 年)参照)。さ inflammatory mediator is reported (refer to the らに、TGF-βはリウマチ性 Journal of Immunology (J. Immunol.), Volume 145, and Page 2514 (1990)).

> Moreover, TGF- (beta-) from promoting an osteogenesis in-vivo

It is thought that it is useful for the treatment of ジャーナル オブ イムノロジ osteoporosis or the periodontitis (refer to the experimental medicine, Volume 8, and Page 345 (1990)), suppressing onset of an experimental multiple sclerosis model animal is 形成を促進することから、骨粗 also reported (it Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.)).

第 8 巻、第 345 頁 (1990 年) Refer to Volume 88 and Page 2918 (1991).



アカデミー オブ サイエンシ ーズ オブザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.), 第88巻、第2918頁 (1991年) 参照)。

[0004]

[0004]

Since

molecular

weight

body, a blood shell loss is carried out within

is

large,

【発明が解決しようとする課 [PROBLEM to be solved by the Invention] 題】

上記の $TGF-\beta$ は、分子量が above-mentioned TGF- (beta-) has a high 大きいことから免疫原性が高 immunogenicity, and has a possibility that a く、反復投与によりアナフィラ repetitive administration may cause the キシーショックを引き起こす虞 anaphylactic shock. れがある。また生体内に投与し Moreover, even if it administers in the living ても数分内に血中から消失し、 有効性が失われる。また大量に several minutes, and effectiveness is lost. 投与することにより、肝臓およ Moreover, by administering in large quantities, び腎臓に対する毒性、非特異的 various side effects, such as a toxicity with な免疫抑制などの種々の副作用 respect to a liver and a kidney and non-specific が発現する可能性がある。しか immunosuppression, may express. るに、本発明の目的は、TGF However, objective of the invention is to provide  $-\beta$  よりも副作用が少なく、か the peptide which has a strong TGF-(beta-) like つ強いTGF-β様活性を有す activity with few side effects rather than TGF-るペプチドを提供することにあ (beta-). る。

[0005]

[0005]

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、上記の目的は、 According 下記の一般式(I)

[MEANS to solve the Problem]

to this invention. the above-mentioned objective, the following  $H - X \uparrow 1$  -Ala  $- X \uparrow 2$  - general formula (I)

7/16/2003

9/30

(C) DERWENT



 $\uparrow$ 3 -Gln - X  $\uparrow$ 4

(I)

選ばれるアミノ酸残基を表し、 **X** ↑ **4** は **Ala** および **Asp** より 基を表し、X↑1 およびX↑5 consists はそれぞれ単結合または Gly、 Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Thr、His、Tyr、 および lle よりなる群から選ば shown above. れる1~5個のアミノ酸残基よ りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す)で示されるペプチドまたは その塩を提供することによって 達成される。

Pro -Cys -Cys -Val - X H-X  $\uparrow$  1-Ala-X  $\uparrow$  2-Pro-Cys-Cys-Val-X  $\uparrow$  3-Gln-X ↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y (I)

- Leu - Glu - X  $\uparrow$  5 - Y (In the Formula, X  $\uparrow$  2 expresses the amino acid residue chosen from the group which consists (式中、X↑2 は Ser および of Ser and Ala, x↑3 expresses the amino acid Ala よりなる群から選ばれるア residue chosen from the group which consists ミノ酸残基を表し、X↑3 は of Ser and Pro, x↑4 expresses the amino acid Ser および Pro よりなる群から residue chosen from the group which consists of Ala and Asp,  $x \uparrow 1$  and  $X \uparrow 5$  express the peptide fragment which consists of a 1-5 amino なる群から選ばれるアミノ酸残 acid residue chosen from the group which of а single bond or Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ser, ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、 expresses a hydroxyl group or an amino group.) Nle It is attained by providing the peptide or its salt

# [0006]

本明細書においては各種アミノ 酸残基を次の略号で記述する。

Ala: L-アラニン残基 Arg: L-アルギニン残基 Asn: L-アスパラギン残基

Asp:L-アスパラギン酸残基 Asp Cys: L-システイン残基

GIn: Lーグルタミン残基 Glu: Lーグルタミン酸残基

Gly : グリシン残基 His: L-ヒスチジン残基

# [0006]

In this specification, the following symbol describes various amino acid residues.

Ala :L- alanine residue

:L- arginine residue Arg

Asn :L- asparagine residue

:L- aspartic-acid residue

Cys :L- cystein residue Gln

:L- glutamine residue Glu :L- glutamic acid residue

Gly : glycine residue His :L- histidine residue



lle: L-イソロイシン残基 lle :L- isoleucine residue Leu: L-ロイシン残基 Leu :L- leucine residue Lys: Lーリシン残基 Lys :L- lysine residue

Phe:L-フェニルアラニン残 Phe :L- phenylalanine residue

基 Pro :L- proline residue Pro : Lープロリン残基 Ser :L- serine residue Ser: Lーセリン残基 Thr :L- threonine residue Thr: Lートレオニン残基 Trp : L-tryptophan residue Trp : Lートリプトファン残基 Tyr :L- tyrosine residue Val

Tyr: Lーチロシン残基 :L- valine residue Val:L-バリン残基 Nle :L- norleucine residue

Nle: Lーノルロイシン残基 アミノ酸残基が右側に位置する ように記述する。

Moreover, in this specification, the amino acid また、本明細書においては、常 residue of the N terminal is positioned in 法に従ってペプチドのアミノ酸 left-hand side in the amino acid sequence of a 配列を、そのN末端のアミノ酸 peptide according to a conventional method, the 残基が左側に位置し、C末端の amino acid residue of a C terminal describes that it is positioned in right-hand side.

# [0007]

上記一般式(I)で示されるペ Following-general-formula プチドのうち、下記一般式(Ⅰ I )

 $H - X \uparrow 6 - A - X \uparrow 7 - Y$   $H - X \uparrow 6 - A - X \uparrow 7 - Y$ (II)

Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln number: 2) Asp Leu Glu (配列番号: 2) 式(3): Ala Ser Pro Cys Cys (sequence number: 3)

### [0007]

(II)among peptides shown with above-mentioned general formula (I)

(II)

(In the Formula, A is a peptide fragment shown (式中、Aは式(1):Ala Ala Pro by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): Glu (配列番号:1)で示され The peptide fragment shown by Ala Ser Pro るペプチド断片、式 (2): Ala Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (sequence

Or Formula (3): The peptide fragment shown by で示されるペプチド断片または Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列 These are expressed, x ↑ 6 and X ↑ 7 express 番号:3) で示されるペプチド the peptide fragment which consists of a 1-5 断片を表し、X ↑6 およびX ↑ amino acid residue chosen from the group



7 はそれぞれ単結合または which consists of a 選ばれる1~5個のアミノ酸残 基からなるペプチド断片を表 し、Yは水酸基またはアミノ基 を表す) で示されるペプチドが 好ましい。

single bond Gly、 Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y Asp、Lys、Thr、His、Tyr、expresses a hydroxyl group or an amino group.) NIe および IIe よりなる群から The peptide shown above is desirable.

# [0008]

ドの代表例を次に示す。

Ala Leu Glu (配列番号:4)、 Pro lle Val (配列番号:5)、 Leu Pro lle Val (配列番号: 7)、(sequence number: 8) Leu (配列番号:8) および 式(9):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln

Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile

Leu (配列番号:9)。

# [8000]

本発明により提供されるペプチ The representative example of the peptide which this invention provides is shown next.

式(4):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val 式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp 式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Asp Leu Glu (配列番号: 6)、 Leu Pro lle Val (sequence number: 7), formula 式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala And formula (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Pro Ile Leu (sequence number: 9).

[0009]

[0009]



塩;ナトリウム、カリウム、カ example.; アルカリ金属またはアルカリ土 potassium, calcium, ンジルアミン、ジエタノールア diethanolamine, ミン、 t ーブチルアミン、ジシ dicyclohexylamine, クロヘキシルアミン、アルギニ mentioned. ンなどとの塩などが挙げられ る。

本発明のペプチドの塩は生理学 The salt of the peptide of this invention is a salt 的に許容される塩であり、その which it accepts physiologically.

塩としては、例えば、塩酸、硫 As its salt, it is a salt with acids, such as the 酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレ hydrochloric acid, a sulfuric acid, a phosphoric イン酸、フマール酸、シュウ酸、 acid, lactic acid, tartaric acid, a maleic acid, a リンゴ酸、クエン酸、オレイン fumaric acid, an oxalic acid, malic acid, a citric 酸、パルミチン酸などの酸との acid, an oleic acid, and a palmitic acid, for

ルシウム、アルミニウムなどの The hydroxide of alkali metals, such as sodium, and aluminium, 類金属の水酸化物または炭酸塩 alkaline-earth metal, or salt with the carbonate; との塩;トリエチルアミン、ベ A salt with a triethylamine, a benzylamine, a а tert butylamine, а the arginine, is

# [0010]

ク質の化学(下)」、第 641-694 会社東京化学同人発行)参照)。

# [0010]

本発明のペプチドは、ペプチド The peptide of this invention is prepared by the の合成において通常用いられる procedure usually used in a synthesis of a 方法、例えば固相合成法または peptide, for example, a solid-phase synthesis 液相合成法によって調製される method, and the liquid-phase synthesis method. が、固相合成法が操作上簡便で However, a solid-phase synthesis method ある(例えば、日本生化学会編 simply on operation comes out, and there is (for 「続生化学実験講座2 タンパ example, refer to the Japanese Biochemical Society edition "chemistry (below) of the sequal 頁(昭和62年5月20日 株式 and biochemistry experiment seminar 2 protein", and Page 641-694 (May 20, Showa 62 K.K. Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. issue)).

# [0011]

などの反応溶媒に不溶性である solvent,

### [0011]

本発明のペプチドの固相合成法 The manufacture by the solid-phase synthesis による調製は、例えば、スチレ method of the peptide of this invention is ンージビニルベンゼン共重合体 combined with a polymer insoluble in reaction such as for example.



重合体に目的とするペプチドの C末端に対応するアミノ酸をそ れが有する $\alpha$  - COOH基を介 して結合させ、次いで該アミノ 端の方向に向かって、対応する アミノ酸またはペプチド断片を 該アミノ酸またはペプチド断片 が有する $\alpha$  - COOH基以外の αーアミノ基などの官能基を保 護したうえで縮合させて結合さ せる操作と、該結合したアミノ 酸またはペプチド断片における αーアミノ基などのペプチド結 合を形成するアミノ基が有する 保護基を除去する操作とを順次 繰り返すことによってペプチド 鎖を伸長させ、目的とするペプ チドに対応するペプチド鎖を形 成し、次いで該ペプチド鎖を重 合体から脱離させ、かつ保護さ プチドを得、次いでこれを精製 することによって実施される。 らの脱離および保護基の除去 は、フッ化水素を用いて同時に から好ましい。また、得られた ペプチドの精製は逆相液体クロ 的である。

[0012]

styrene-divinylbenzene copolymer, through the (alpha)-COOH group on which it has an amino acid corresponding to the C terminal of the peptide made into the objective.

酸に目的とするペプチドのN末 Subsequently, the operation which it is made to condense after protecting functional groups, such as (alpha)- amino groups other than the (alpha)-COOH group on which this amino acid or a peptide fragment has the amino acid or peptide fragment which goes and corresponds to this amino acid in the direction of N terminal of the peptide made into the objective, and is combined, a peptide chain is expanded by repeating in order operation of removing the protecting group which the amino group which forms a peptide bond of the (alpha)- amino group in this united amino acid or united peptide fragment etc. has.

> The peptide chain corresponding to the target peptide is formed, subsequently, this peptide chain is desorbed from a polymer.

れている官能基から保護基を除 And the target peptide is obtained by removing 去することにより目的とするペ a protecting group from the functional group protected, subsequently, it implements by purifying this.

ここで、ペプチド鎖の重合体か Here, it is desirable to perform simultaneously elimination of the desorption and the protecting group from the polymer of a peptide chain using 行うのが副反応を抑制する観点 hydrogen fluoride from a viewpoint which suppresses a side reaction.

Moreover, it is effective to perform purification of マトグラフィーで行うのが効果 the obtained peptide by the reversed phase liquid chromatography.

### [0012]

また、本発明のペプチドの塩は、 Moreover, the salt of the peptide of this



とにより調製される。

通常の塩生成反応を利用するこ invention is prepared by utilizing normal salt generation reaction.

### [0013]

おいて低毒性であることが確認 examination. されている。

### [0014]

どの治療に有用である。また、 本発明のペプチド類は、臓器移 する。

#### [0015]

本発明のペプチド類は、骨折、 性関節症、骨粗鬆症、歯周病、 多発性硬化症などの患者に投与 症状を軽減することができる。

# [0016]

ペプチド類の有効な活性発現の ための投与量は、疾病、患者の どにより異なるが、通常成人1 medicine, etc.

### [0013]

後述の試験例から明らかなとお The peptide of this invention and its salt (these り、本発明のペプチドおよびそ are hereafter called peptides roughly) have a の塩(以下、これらをペプチド TGF-(beta-) like activity a passage clear from 類と略称する)は、TGF $-\beta$  the below-mentioned EXPERIMENT, and the 様活性を有し、かつ毒性試験に low\_toxic thing is confirmed in the toxic

### [0014]

以上の結果から、本発明のペプ The peptides of the above result to this チド類は骨折、創傷、リウマチ invention are useful for the treatment of 性関節炎、変形性関節症、骨粗 fracture, a wound, a rheumatic arthritis, 鬆症、歯周病、多発性硬化症な osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc.

Moreover, the peptides of this invention 植後の拒絶反応を効果的に抑制 suppress the rejection after an organ transplant effectively.

#### [0015]

The peptides of this invention can lighten the 創傷、リウマチ性関節炎、変形 above-mentioned disease person's symptom by administering to patients, such as fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, することにより、上記罹患者の osteoporosis, a periodontal disease, and multiple sclerosis.

#### [0016]

The dosage for an effective active expression of peptides changes with the illness, a patient's 重篤度、薬物に対する忍容性な seriousness, tolerances with respect to a

日当たり、0.01  $\mu$  g  $\angle$  kg $\sim$  However, they are normal adult 1 sunny and



2 g / kg であり、好ましくは 0.01 microgram/kg - 2 g/kg. /kg である。

0.  $0.1 \mu \text{ g/kg} \sim 2.0 \text{ 0 mg}$  Preferably it is 0.01 microgram(s)/kg - 200 mg/kg.

# [0017]

に許容される種々の添加剤を含 additive

### [0017]

投与形態としてはペプチド類を The solution obtained by dissolving peptides in 5 %ブドウ糖液や生理食塩水な solutions which can accept physiologically, such どの生理学的に許容し得る溶液 as 5-% glucose liquid and physiological saline, に溶解させて得られる溶液が好 as an administration form is desirable, ましく、また該溶液は薬理学的 moreover, this solution may contain the various agent which it accepts pharmacologically.

# [0018]

んでいてもよい。

下投与、腹腔投与、関節内投与、 経皮投与などが挙げられ、さら an はリポソーム化することにより administration, 経口投与も可能である。

#### [0018]

投与方法としては静脈投与、皮 As the administration procedure, an intravenous administration, a subcutaneous administration, abdominal-cavity administration, にペプチド類をカプセル化また administration in a joint, a percutaneous etc. are mentioned, administration can also further do peptides capsulation or by liposome-izing.

[0019]

[0019]

#### 【実施例】

体的に説明する。なお、本発明 invention concretely.

れるものではない。

#### [EXAMPLES]

以下、実施例により本発明を具 Hereafter, an Example demonstrates this

はこれらの実施例により限定さ In addition, this invention is not limited by these Examples.

# [0020]

実施例1

Ala LeuGlu (配列番号:4)で LeuGlu

#### [0020]

Example 1

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Formula (4): The peptide shown by Asn Pro Gly Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala (sequence number: was



動合成装置を用いて固相合成法 により合成した。すなわち、4 - [N-(t-ブトキシカルボ ニル) - y - ベンジルー L - グ ルタミルオキシメチル]-フェ 0.70ミリモル/g(樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ 樹脂〔米国アプライド・バイオ システムズ社製、PAMグルタ ミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl) ] 0. アミノ酸として、米国アプライ ド・バイオシステムズ社製のN  $\uparrow \alpha - (t - \vec{J}) + \vec{J} + \vec{$ ル) - L - グルタミン [t-Boc グ (t-Boc asparagine), [t-Boc ロイシン]、N-(t- cystein ロリン (t-Boc プロリン)、N-andLーグリシン〔t-Boc グリシ respectively. ン〕、N-(t-ブトキシカルボ ニル) - L - アスパラギン 〔t-Boc アスパラギン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-OーベンジルーLーセリン (t-Boc セリン)、N-(t-ブ トキシカルボニル) - S - (p

示されるペプチドをペプチド自 compounded by the solid-phase synthesis method using the peptide automatic-synthesis apparatus.

That is, 0.1 millimoles of the grain-shape resin (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzI)) which consists of a ニルアセトアミドメチル基を styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which it has at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, 4 -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)benzyl-ル比:99対1〕からなる粒状 glutamyl oxy methyl)- The amino acid was combined for the phenyl acetamide methyl group in order toward N edge of a peptide.

For joint reaction, as an amino acid, the N 1 1ミリモルを用い、ペプチドの (alpha)-(t-butoxycarbonyl)-L- glutamine by USA N端に向かって順次アミノ酸を Applied Biosystems (t-Boc glutamine), a 結合させた。結合反応において、 N-(t-butoxycarbonyl)-L- leucine (t-Boc leucine), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- proline (t-Boc proline), N-(t-butoxycarbonyl)-Lglycine glycine), N-(t-butoxycarbonyl)-L- asparagine N-(t-butoxycarbonyl)-O- $\mu$  ルタミン]、N-(t-ブトキシ benzyl- L- serine (t-Boc serine), カルボニル) ー L ー ロイシン N-(t-butoxycarbonyl)-S-(p- methoxy benzyl)-L-(t-Boc cystein), ブトキシカルボニル)-L-プ N-(t-butoxycarbonyl)-L- valine (t-Boc valine), 1 millimole (t-Boc alanine) (tーブトキシカルボニル) — N-(t-butoxycarbonyl)-L- alanines were used,



ーメトキシベンジル) - L - シ ステイン〔t-Boc システイン〕、  $N-(t-\overline{J})$ ーレーバリン〔t-Boc バリン〕、  $N-(t-\overline{y})$ ーLーアラニン〔t-Boc アラニ ン〕をそれぞれ1ミリモル用い た。

# [0021]

相からの脱離を行った。粗生成 about the obtained peptide. -80TM CTR、移動相: のピークが示された。 FAB法 spectrum was 1527 マススペクトルにより求めた精 1527.72). 製ペプチドの分子量は1527 であった(理論値:1527. 72).

### [0021]

得られたペプチドについて株式 The desorption from de-protection and a 会社ペプチド研究所製のHF反 solid-phase was performed using the HF 応装置 I 型を用いて脱保護と固 reactor I type by Peptide Institute. Inc., K.K.,

物をミリポア・ウォーターズ社 The crude product was purified by the 製分取用高速液体クロマトグラ high-speed liquid chromatograph for フ〔カラム:デルタパックC1 aliquoting made from the Millipore \* Waters Inc.  $8 ext{ } 4 ext{ } 7 ext{ } ext{ } 3 ext{ } 0 ext{ } 0 ext{ mm} ext{ } ext{$ パック1000加圧モジュール pack 1000 pressurization module).

付] で精製した。得られた精製 About the obtained purification peptide, it is a ペプチドを島津製作所株式会社 high-speed liquid chromatograph for the LC6AA 製LC6A分析用高速液体クロ analysis by Shimadzu K.K. (column: attaching マトグラフ [カラム:東ソー株 to Tosoh Corp. TSKgel ODS-80TM CTR CTR). 式会社製TSKgel ODS Mobile phase: The single peak was shown by 18.8min when the trifluoroacetic acid was トリフルオロ酢酸を 0.05 容 attached to the mixed solvent (acetonitrile 量%含有するアセトニトリルと density was changed from 5 volume % to 50 水の混合溶媒 (アセトニトリル volume % in 30 minutes) of the acetonitrile 濃度を30分間で5容量%から which contains 0.05 volume %, and water.

5 0 容量%に変化させた)] に付 The molecular weight of the purification peptide したところ、18.8 min に単一 for which it required by the FAB method mass (theoretical value:



# [0022]

実施例2~6および比較例1 示されるペプチド(実施例2)、 Asp Leu Glu (配列番号: 6) Pro lle Leu (配列番号:9)で 示されるペプチド(実施例6)、 および式(10): Gly Pro Cys Pro Tyr lle Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号:10) で示されるペプチド(比較例1) を実施例1と同様の方法により 合成した。

### [0023]

# [0022]

Example 2-6 and Comparative Example 1 式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Formula (5): Peptide (Example 2) shown by Ala Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Pro IleVal (配列番号:5)で Leu Pro IleVal (sequence number: 5), formula (6): Peptide (Example 3) shown by Ala Pro Glu 式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Peptide (Example 4) shown by Ala Ser Pro Cys で示されるペプチド(実施例 Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val 3)、式(7): Ala Ser Pro Cys (sequence number: 7), formula (8): Peptide Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu (Example 5) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Pro Leu Pro lle Val (配列番 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro 号:7)で示されるペプチド(実 Leu Thr lle Leu (sequence number: 8), formula 施例4)、式(8): Asn Pro Gly (9): Peptide (Example 6) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro AspLeu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (sequence Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) number: 9), and formula (10): Peptide で示されるペプチド(実施例 (Comparative Example 1) shown by Gly Pro 5)、式(9): Asn Pro Gly Ala Cys Pro Tyr lle Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val was compounded by the procedure similar to Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu Example 1 (sequence number: 10).

#### [0023]

実施例2および実施例4では4 In Example 2 and Example 4, it is 4. - [N-(t-valyl oxy methyl)- 0.1 ニル) ー L ー バリルオキシメチ millimoles (USA Applied Biosystems make,



チル基を0.68ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレ ンージビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼン の構成モル比:99対1]から なる粒状樹脂〔米国アプライ ド・バイオシステムズ社製、P AMバリン、t-Boc-L-Val 〕 0. 1ミリモルを用い、実施例3で は4-[N-(tーブトキシカ ルボニル) - γ - ベンジルー L ーグルタミルオキシメチル〕ー フェニルアセトアミドメチル基 を 0.70ミリモル/g(樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ ル比: 99対1〕からなる粒状 樹脂〔米国アプライド・バイオ システムズ社製、PAMグルタ ミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl) ] 0. 1ミリモルを用い、実施例5及 び実施例6では4- [N-(t ーブトキシカルボニル)ーLー ロイシルオキシメチル〕-フェ ニルアセトアミドメチル基を 0. 68ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ 樹脂〔米国アプライド・バイオ システムズ社製、PAMロイシ ン、t-Boc-L-Leu 〕 0. 1ミリ モルを用い、比較例1では4-

ル] ーフェニルアセトアミドメ PAM valine, t-Boc-L-Val) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Example 3, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)- benzyl- Lglutamyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzI)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, in Example 5 and Example 6, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-Lleucyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, a PAM leucine, t-Boc-L-Leu) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in 4. Example it is Comparative 1, -(N-(t-butoxycarbonyl)-O- benzyl- L- seril oxy methyl)-0.1 millimoles (USA Biosystems make, PAM serine, t-Boc-L-Ser (BzI)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group ル比:99対1〕からなる粒状 at a ratio of 0.72 millimoles (resin)/g were used.



[N-(t-ブトキシカルボニ ル) - O - ベンジルー L - セリ ルオキシメチル] -フェニルア セトアミドメチル基を0.72 ミリモル/g (樹脂)の割合で 有するスチレンージビニルベン ゼン共重合体〔スチレンとジビ ニルベンゼンの構成モル比:9 9対1〕からなる粒状樹脂〔米 国アプライド・バイオシステム ズ社製、PAMセリン、 t-Boc-L-Ser(BzI)) 0. 1ミリモ ルを用いた。

# [0024]

例1で用いたものに加えて米国 Example ボニル) -O-(2-ブロモベ Biosystemsンジルオキシカルボニル)-L N-(t-butoxycarbonyl)-L-ーチロシン〔t-Boc チロシン〕、 ソロイシン]、N-(t-ブトキ acid ルタミン酸]、Nー(tーブトキ シカルボニル) - β - ベンジル - L-アスパラギン酸〔t-Boc アスパラギン酸]、N ↑ α - (t -ブトキシカルボニル) - NInd ーホルミルーLートリプトファ ン〔t-Boc トリプトファン〕を 用いた。

# [0024]

また、アミノ酸としては、実施 As an amino acid, it adds to what was used in Moreover. 1. アプライド・バイオシステムズ N-(t-butoxycarbonyl)-O-(2-bromo 社製のN- (tーブトキシカル benzyloxycarbonyl)-L- tyrosine by USA Applied the tyrosine), (t-Boc (t-Boc isoleucine n-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)isoleucine), N-(t-ブトキシカルボニル) benzyl- L- glutamic acid (t-Boc glutamic acid), - L - イソロイシン [t-Boc イ N-(t-butoxycarbonyl)-(beta)- benzyl- L- aspartic aspartic acid), 1 (t-Boc シカルボニル) ー γ ーベンジル (alpha)-(t-butoxycarbonyl)-NInd-formyl-- L - グルタミン酸〔t-Boc グ L-tryptophan (t-Boc tryptophan) were used.



# [0025]

を行い、粗生成物を精製した。 ラフにおける溶出時間およびF て示す。

[0026]

【表1】

# [0025]

得られたそれぞれのペプチドに In Example 1, the desorption from de-protection ついて実施例1におけると同様 and a solid-phase was similarly performed にして脱保護と固相からの脱離 about each obtained peptide, and the crude product was purified.

それぞれの精製ペプチドについ About each purification peptide, the elution time て、分析用高速液体クロマトグ in the high-speed liquid chromatograph for an and analysis AB法マススペクトルによる分 determination-of-molecular-weight result by the 子量測定結果を第1表にまとめ FAB method mass spectrum are summarized in Table 1, and are shown.

[0026]

[TABLE 1]

#### 第 表

実施例	溶出時間	精製ペ	<b>プチド</b>	(理論値)		
または比較例	(min)	式番号	分子量	(土爾里)		
実施例2	23.9	(5)	1620	1620.97		
実施例3	18.0	(6)	1658	1659.79		
実施例4	23.8	(7)	1680	1680.98		
実施例 5	25.5	(8)	2112	2 1 1 5 . 3 8		
実施例 6	25.0	(9)	2111	2111.39		
比較例1	2.3. 4	(10)	1631	1629.78		
				i		

First Table

Example or Comparative Example; Elution time; Purification Peptide (Formula number; Molecular weight); (Theoretical value)



Example 2

Comparative Example 1

[0027]

試験例1

臓細胞の増殖抑制試験

を、コンカナバリンA: 3 μ g /ml、2ーメルカプトエタノー A-concanavalin-A:3 ル:50 μ M、牛胎児血清:1 3%の割合でそれぞれ含有する R P M I - 1 6 4 0 培地に分散 し、5000個/ウエルの割合 胞のDNAを標識し、蛍光強度 を測定することにより生細胞数 をカウントした。ペプチドは1  $00\mu g/ml$ , TGF- $\beta l$ ng/ml の濃度になるようにそ 前に添加した。コンカナバリン Aを加えないウエルに対するコ ンカナバリンAのみを加えたウ エルの生細胞数の増加を1とし て、ペプチドまたはTGF-β を加えた時の生細胞数の減少を 抑制率として表した。結果を第 A result is shown in Table 2. 2表に示す。

[0027]

**Experiment 1** 

コンカナバリンA刺激マウス脾 The growth-inhibition examination of the A-concanavalin-A irritation mouse spleen cell BALB/cマウス脾臓細胞 The BALB/c-mouse spleen cell is dispersed to which contains RPMI-1640 medium microgram/ml, and 2-mercaptoethanol:50 micronM. foetal-bovine-serum:13% ratio, respectively, it dispenses on 96 well plate at a ratio of 5000 piece / well, 7% CO ↓ 2 -- it cultivated for seven で 9 6 ウエルプレートに分注 days at 37 degrees C in presence.

し、7%CO↓2 存在下37℃ DNA of a living cell is labeled with propidium で7日間培養した。培養後プロ iodide after cultivating, the living cell number ピディウムアイオダイドで生細 was counted by measuring a fluorescence intensity.

> The peptide added 100 microgram(s)/ml and TGF- (beta-) just before the A-concanavalin-A irritation, respectively so that it might become the density of 1 ng/ml.

れぞれコンカナバリンA刺激直 The increase in the living cell number of the well which added only the A concanavalin A with respect to the well which does not add the A concanavalin A is set to 1, the reduction of the living cell number when adding a peptide or TGF- (beta-) was expressed as a suppression rate.

[0028]

[0028]



# 【表2】

# [TABLE 2]

#### 第 2 表

実施例または比較例	ペプチド	抑制率(%)
JL #X P!		
_	т G F — <i>β</i>	8 5
実施例 1	式 (4) で表されるペプチド	6 0
実施例2	式(5)で表されるペプチド	7 0
実施例3	式(6)で表されるペプチド	6 5
実施例 4	式(7)で表されるペプチド	7 3
実施例 5	式 (8) で表されるペプチド	7 0
実施例6	式 (9) で表されるペプチド	7 2
比較例1	式 (10) で表されるペプチド	2

#### Second Table

Example or Comparative Example; Peptide; Suppression rate

Example 1; Peptide expressed with formula (4)

Comparative Example 1; ...

# [0029]

[0029]

れたペプチドの抑制率は60% Example 6 is 60% - 73%. ~73%であり、本発明のペプ It is clear that the peptide of this invention

第2表のとおり、TGF- $\beta$ の As opposed to the suppression rate of TGF-抑制率が85%であるのに対し (beta-) being 85% as Table 2, the suppression て、実施例1~実施例6で得ら rate of the peptide obtained in Example 1-

24/30 (C) DERWENT 7/16/2003



チドがTGF-β様の活性を示 shows TGF-(beta) -like activity. すことは明らかである。

[0030]

試験例2

軟寒天中のコロニー形成試験 0個/シャーレの割合で直径1 Ocm のシャーレに撒き、7% CO↓2 存在下37℃で7日間 C. 直径を有するコロニーの割合を searched for. ルの平均33%と比較して有意 promoted significantly. にコロニー形成が促進された。

[0031]

【発明の効果】

化症、リウマチ性関節炎、変形 multiple 性関節症、骨粗鬆症、歯周病な osteoarthritis, どの治療に有効であり、また臓 disease, etc. 器移植後の拒絶反応を効果的に Moreover, the rejection 抑制することができる。

[0030]

Experiment 2

The colony formation examination in soft agar 2.5 ng/ml ØEGF、10% NRK-49F cell is scattered at a ratio of 1000 の牛胎児血清及び 0 . 5 %の寒 piece / Petri dish at a Petri dish with a diameter 天を含むイーグルのMEM培地 of 10 cm to the MEM medium of the eagle にNRK-49F細胞を100 containing 2.5-ng/ml EGF, 10% of foetal bovine serum, and 0.5% of agar, in presence of 7% CO ↓ 2, it cultivated for seven days at 37 degrees

培養した。ニュートラルレッド A living cell is colored by the neutral red, the で生細胞を染色し、コロニー1 ratio of a colony of having the diameter of 70 00個あたりの70μm以上の micromerter or more per 100 colonies was

求めた。その結果、実施例1で Consequently, when the peptide obtained in 得られたペプチドを300μg Example 1 is added by 300 microgram(s)/ml /ml の濃度で添加したときに density, an average of 58% of colony is formed, 平均 5 8 %のコロニーが形成さ compared with an average of 33% of the control れ、何も添加しないコントロー which nothing adds, colony formation was

[0031]

[ADVANTAGE of the Invention]

本発明により提供されるペプチ The peptides which this invention provides are ド類は、骨折、創傷、多発性硬 effective in the treatment of fracture, a wound, sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoporosis, а periodontal

> after an organ transplant can be suppressed effectively.



[0032]

[0032]

【配列表】

[SEQUENCE TABLE]

配列番号:1

Sequence number: 1 Sequence length: 11

配列の長さ:11

Sequence type: Amino acid

配列の型:アミノ酸 トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

1

5

10

Sequence

[0033]

[0033]

配列番号:2

Sequence number: 2

配列の長さ:11

Sequence length: 11

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gin Asp Leu Giu

1

5

10

Sequence

[0034]

[0034]

配列番号:3

Sequence number: 3

配列の長さ:11

Sequence length: 11

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide



配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu 5

Sequence

[0035]

配列番号:4

配列の長さ:16

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Cys Cys Val Pro Gin Ala Leu Pro Gin Ala Leu Glu

Glu

1

10

[0036]

配列番号:5

配列の長さ:16

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Pro Leu Pro Ile Val

Val

1 10

[0037]

配列番号:6 配列の長さ:16 [0035]

Sequence number: 4

Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

1

5 15

15

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val

5

10

[0036]

Sequence number: 5 Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

5

10

[0037]

1

5 15

15

Sequence number: 6

Sequence length: 16



配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Val

Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Pro Gln Asp Leu Glu

Glu

1

5

10

1

5 15

10

15

[0038]

[0038]

配列番号:7

Sequence number: 7

配列の長さ:16

Sequence length: 16

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid Topology: Linear

トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu

5

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Pro Leu Pro Ile Val

Ile Val 1

1 5 15

10

15

15

[0039]

[0039]

配列番号:8

Sequence number: 8

配列の長さ:21

Sequence length: 21

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu

Glu

1

5

10

10

1

5 15

10

Pro Leu Thr lle Leu

Pro Leu Thr Ile Leu

20



20

[0040]

配列番号:9 Sequence number: 9

配列の長さ:21 Sequence length: 21

配列の型:アミノ酸 Sequence type: Amino acid

トポロジー: 直鎖状 Topology: Linear

配列の種類:ペプチド Type of sequence: Peptide

配列 Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu

Glu 1 5 10

1 5 15

10 15 Pro Leu Pro lle Leu

Pro Leu Pro Ile Leu 20

20

[0041]

配列番号: 1 0 Sequence number: 10 配列の長さ: 1 4 Sequence length: 14

配列の型:アミノ酸 Sequence type: Amino acid

トポロジー: 直鎖状 Topology: Linear

配列の種類:ペプチド Type of sequence: Peptide

配列 Sequence

Gly Pro Cys Pro Tyr lle Trp Ser Gly Pro Cys Pro Tyr lle Trp Ser Leu Asp Thr Gln

Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Tyr Ser

1 5 1 5 10

10



# **DERWENT TERMS AND CONDITIONS**

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

"WWW.DERWENT.CO.UK" (English)

"WWW.DERWENT.CO.JP" (Japanese)

09/421,545

JP6-25288-A



# MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

(19)[ISSUING COUNTRY]

日本国特許庁(JP)

Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

(12)[GAZETTE CATEGORY]

公開特許公報 (A)

Laid-open Kokai Patent (A)

(11)【公開番号】

(11)[KOKAI NUMBER]

特開平6-25288

Unexamined Japanese Patent (1994-25288)

Heisei 6-25288

(43)【公開日】

(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]

平成6年(1994)2月1日 (1994.2.1)

(54)【発明の名称】

(54)[TITLE of the Invention]

ペプチドまたはその塩

PEPTIDE OR ITS SALT

8314-4C

(51)【国際特許分類第5版】

(51)[IPC Int. Cl. 5]

C07K 7/08

ZNA C07K 7/08

ZNA 7537-4H

7537-4H

7/06 Z 7/10 Z 8318-4H 7537-4H

8318-4H

// A61K 37/02

ABG

\_.

n Aunt one

ADG

7/10

7/06

ABJ

7537-4H

ACK

// A61K 37/02

ADA

ABJ

ABG

ADF

ACK

C07K 99:00

ADA

8314-4C

**ADF** 

C07K 99:00

【審查請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No



【請求項の数】 3

[NUMBER OF CLAIMS] 3

【全頁数】 9

[NUMBER OF PAGES] 9

(21)【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特願平4-207501

Japanese Patent Application (1992-207501)

Heisei 4-207501

(22)【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成4年(1992)7月10 (1992.7.10)

日

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

000001085

000001085

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

株式会社クラレ

Kuraray Co., Ltd.

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

谷原 正夫

Tanihara Masao

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津2045番地

の1 株式会社クラレ内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

7/16/2003 2/30 (C) DERWENT



【氏名】

藤原 千絵

[NAME OR APPELLATION]

Chie Fujiwara

【住所又は居所】

岡山県倉敷市酒津2045番地

の1 株式会社クラレ内

[ADDRESS or DOMICILE]

(57)【要約】

(57)[ABSTRACT of the Disclosure]

【構成】

下記の一般式

 $-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln \uparrow 4-Leu-Glu-X \uparrow 5-Y$ 

Y

(式中、X↑2 は Ser および and Ala in the Formula. Ser および Pro よりなる群から 選ばれるアミノ酸残基を表し、 X. ↑ 4 は Ala および Asp より はそれぞれ単結合または Gly、 Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Thr、 His、 Tyr, れる1~5個のアミノ酸残基よ has a TGF-(beta-) like activity. りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す) で示され、かつ $TGF-\beta$ 様活性を有するペプチドまたは

#### [CONSTITUTION]

The following general formula

 $H = X \uparrow 1 - Ala = X \uparrow 2 - Pro$  H-X  $\uparrow$  1-Ala-X  $\uparrow$  2-Pro-Cys-Cys-Val-X  $\uparrow$  3-Gln-X

 $-X \uparrow 4$ —Leu—Glu— $X \uparrow 5$ — (X  $\uparrow 2$ , expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser

Ala よりなる群から選ばれるア X↑3 expresses the amino acid residue chosen ミノ酸残基を表し、X↑3 は from the group which is made of Ser and Pro, X ↑4 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp, x ↑1 and X↑5 express the peptide fragment なる群から選ばれるアミノ酸残 which is made of a 1-5 amino acid residue 基を表し、X↑1 およびX↑5 chosen from the group which is made of a single bond Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L ys,Thr,His,Tyr,Nle, and lle, respectively, y NIe expresses a hydroxyl group or an amino group.) および lle よりなる群から選ば It shows above, and the peptide or its salt which



その塩。

#### 【効果】

ウマチ性関節炎、変形性関節症、 骨粗鬆症、歯周病などの治療に 有用であり、また臓器移植後の disease, etc. 拒絶反応を効果的に抑制する。

### 【特許請求の範囲】

#### 【請求項1】

一般式

 $-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln$  $-X \uparrow 4$  Leu  $-Glu - X \uparrow 5$ 

選ばれるアミノ酸残基を表し、 **X ↑4 は Ala および Asp より** はそれぞれ単結合または Gly、 Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Thr、His、Tyr、 Nle Lys および IIe よりなる群から選ば has a TGF-(beta-) like activity. れる1~5個のアミノ酸残基よ りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す。) で示され、かつ $TGF-\beta$ 

# [ADVANTAGE]

骨折、創傷、多発性硬化症、リ It is useful for the treatment of fracture, a wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal

> Moreover, the rejection after an organ transplant is suppressed effectively.

#### [CLAIMS]

#### [CLAIM 1]

General formula

 $H - X \uparrow 1 - Ala - X \uparrow 2 - Pro H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln-X$ ↑4-Leu-Glu-X ↑5-Y

(X ↑ 2, expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser (式中、X↑2 は Ser および and Ala in the Formula, x↑3 expresses the Ala よりなる群から選ばれるア amino acid residue chosen from the group ミノ酸残基を表し、 X ↑ 3 は which is made of Ser and Pro, x ↑ 4 expresses Ser および Pro よりなる群から the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp,  $x \uparrow 1$  and  $X \uparrow 5$ express the peptide fragment which is made of なる群から選ばれるアミノ酸残 a 1-5 amino acid residue chosen from the group 基を表し、X↑1 およびX↑5 which is made of a single bond or Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ala、Val、Arg、Asn、Ser、ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which



様活性を有するペプチドまたは その塩。

### 【請求項2】

#### 一般式

 $H-X \uparrow 6-A-X \uparrow 7-Y$ 

Asp Leu Glu (配列番号: 2) Asp、Lys、Thr、His、 Tyr. Nle および lle よりなる群から 選ばれる  $1 \sim 5$  個のアミノ酸残 The peptide or its salt of Claim 1 shown now. 基からなるペプチド断片を表 し、Yは水酸基またはアミノ基 を表す。)で示される請求項1記 載のペプチドまたはその塩。

#### 【請求項3】

#### 下記の

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Leu Glu (配列番号:4)、 式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro lle Val (配列番号:5)、

#### [CLAIM 2]

General formula

H-X ↑ 6-A-X ↑ 7-Y

(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro (In the Formula, A is a peptide fragment shown Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Glu (配列番号: 1)で示され Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): るペプチド断片、式 (2): Ala The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Ser Pro Cys Cys Val ProGln Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

で示されるペプチド断片または Or Formula (3): Expressing the peptide 式 (3): Ala Ser Pro Cys Cys fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列 Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3), x↑6 番号:3)で示されるペプチド and X↑7 express the peptide fragment which is 断片を表し、X ↑6 およびX ↑ made of a 1-5 amino acid residue chosen from 7 はそれぞれ単結合または the group which is made of a single bond or Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、ys,Thr,His,Tyr,Nle, and lle, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group. )

#### [CLAIM 3]

#### Following

Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp



Asp Leu Glu (配列番号: 6)、 Leu Pro lle Val (配列番号: 7)、 式(8):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr lle Leu (配列番号:8) または 式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro lle Leu (配列番号:9) で示される請求項1記載のペプ チドまたはその塩。

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula 式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (sequence number: 8)

> Or formula (9): The peptide or its salt of Claim 1 shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Vai Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro lle Leu (sequence number: 9).

【発明の詳細な説明】

DESCRIPTION the [DETAILED of INVENTION]

[0001]

[0001]

#### 【産業上の利用分野】

節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、 歯周病、多発性硬化症などの治 療に有用であり、また臓器移植 transplant can be suppressed effectively. 後の拒絶反応を効果的に抑制す ることができる。

#### [INDUSTRIAL APPLICATION]

本発明はTGF-β様活性を有 This invention relates to the peptide or its salt するペプチドまたはその塩に関 which has a TGF-(beta-) like activity.

する。本発明により提供される Since the peptide or its salt which this invention ペプチドまたはその塩は、TG provides has a TGF-(beta-) like activity, it is  $F-\beta$  様活性を有することか useful for the treatment of fracture, a wound, a ら、骨折、創傷、リウマチ性関 rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc. Moreover, the rejection after an organ



[0002]

[0002]

# 【従来の技術】

TGF(トランスフォーミング TGF(transforming ファクター transforming βは、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的 makes 性質を発現させる腫瘍由来因子 oncocyte-characteristic, (臨床免疫、第 24 巻、第 146 (1992)). ザ ナショナル アカデミー (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.).) 頁 (1988年)参照)、ラットの正 常線維芽細胞であるNRK-4 は増殖抑制因子として作用する ことが明らかになっている(カ レント トピックス イン デ ィベロップメンタル バイオロ (Current Topics in Developmental Biology)、第24 巻、第95頁 (1990年)参照)。

#### [PRIOR ART]

factor growth (beta-) growth factor)transforming growth factor) - discovered as a tumor origin factor which the non-oncocyte express normal after that, として発見され、その後、血小 tissues, such as blood platelets, macrophage, a 板、マクロファージ、骨、腎臓 bone, and a kidney, also discovered (refer to a などの正常組織にも発見された clinical immunology, Volume 24, and Page 146

頁 (1992年)参照)。活性型のT As for activated TGF- (beta-), molecular weight  $GF-\beta$  は分子量が約25 k D exists as a homo dimer of about 25 kD(s).

のホモダイマーとして存在し (Proceedings of the National Academy of the (プロシーディングス オブ Sciences of the United States of America

オブ サイエンシーズオブ ザ It causes transforming reversibly to NRK-49F ユナイテッド ステイツ オブ strain which is the normal fibroblast of Volume アメリカ (Proc. Natl. Acad. 85, refer Page 4715 (1988), and a rat, it has the Sci.USA.)、第 85 巻、第 4715 effect which promotes propagation by the soft agar.

However, it becomes clearly to act as a 9F株に対して可逆的に形質転 growth-inhibition factor to many cell in addition 換を引き起こし、軟寒天培地で to this (refer Current Topics in Developmental の増殖を促進する作用を有する Biology (Current Topics in Developmental が、その他多くの細胞に対して Biology), Volume 24, and Page 95 (1990)).



[0003]

TGF-βは血管の新生を促進 し、かつ細胞外基質蛋白質の合 成を促進することから、骨折の 接合作用または創傷治癒効果を 有すると考えられる(サイエン ス(Science)、第 237 巻、第 1333 頁 (1987年)参照)。また、TG F-βは強力な免疫抑制作用を 絶反応を抑制することが報告さ ミー オブ サイエンシーズ オブ ザ ユナイテッド ステ イツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、第87巻、 第 1591 頁 (1990 年)参照)。さ らに、TGF-βはリウマチ性 関節炎の患者の関節液中に存在 し、強力な炎症性メディエータ である I L-1の作用を中和す ることが報告されている(ザ ジャーナル オブ イムノロジ ー (J. Immunol.)、第 145 巻、 第 2514 頁 (1990 年)参照)。ま た、TGF-βは in vivo で骨 形成を促進することから、骨粗 鬆症または歯周炎の治療に有用 であると考えられ(実験医学、 参照)、実験的多発性硬化症モデ ル動物の発症を抑制することも 報告されている(プロシーディ ングス オブ ザ ナショナル

7/16/2003

#### [0003]

Furthermore, TGF- (beta-) exists in the synovial fluid of the patient of a rheumatic arthritis, neutralizing an effect of IL-1 which is a forceful inflammatory mediator is reported (refer to the Journal of Immunology (J. Immunol.), Volume 145, and Page 2514 (1990)).

Moreover, TGF- (beta-) from promoting an osteogenesis in-vivo

It is thought that it is useful for the treatment of osteoporosis or the periodontitis (refer to the experimental medicine, Volume 8, and Page 345 (1990)), suppressing onset of an experimental multiple sclerosis model animal is also reported (it Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.)).

第 8 巻、第 345 頁 (1990 年) Refer to Volume 88 and Page 2918 (1991).



アカデミー オブ サイエンシ ーズ オブザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.), 第 88 巻、第 2918 頁 (1991 年) 参照)。

[0004]

[0004]

Since

【発明が解決しようとする課 [PROBLEM to be solved by the Invention] 題】

キシーショックを引き起こす虞 anaphylactic shock. ても数分内に血中から消失し、 が発現する可能性がある。しか immunosuppression, may express. るに、本発明の目的は、TGF るペプチドを提供することにあ (beta-). る。

[0005]

[0005]

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、上記の目的は、 According 下記の一般式(I)

 $H-X \uparrow 1$  -Ala  $-X \uparrow 2$  - general formula (I)

molecular

上記のTGF- $\beta$ は、分子量が above-mentioned TGF- (beta-) has a high 大きいことから免疫原性が高 immunogenicity, and has a possibility that a く、反復投与によりアナフィラ repetitive administration may cause

weight

is

large,

れがある。また生体内に投与し Moreover, even if it administers in the living body, a blood shell loss is carried out within 有効性が失われる。また大量に several minutes, and effectiveness is lost.

投与することにより、肝臓およ Moreover, by administering in large quantities, び腎臓に対する毒性、非特異的 various side effects, such as a toxicity with な免疫抑制などの種々の副作用 respect to a liver and a kidney and non-specific

However, objective of the invention is to provide ーβよりも副作用が少なく、か the peptide which has a strong TGF-(beta-) like つ強いTGF $-\beta$  様活性を有す activity with few side effects rather than TGF-

[MEANS to solve the Problem]

invention, the this above-mentioned following objective, the



 $\uparrow$ 3 -Gln -X  $\uparrow$ 4 (I)

選ばれるアミノ酸残基を表し、 **X ↑4** は **Ala** および **Asp** より 基を表し、X↑1 およびX↑5 consists はそれぞれ単結合または Gly、 Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Thr、 His、 Lvs Tyr, および lle よりなる群から選ば shown above. れる1~5個のアミノ酸残基よ りなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表 す) で示されるペプチドまたは その塩を提供することによって 達成される。

Pro -Cys -Cys -Val - X +X ↑ 1-Ala-X ↑ 2-Pro-Cys-Cys-Val-X ↑ 3-Gln-X ↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y **(I)** 

- Leu - Glu -  $X \uparrow 5$  - Y (In the Formula,  $X \uparrow 2$  expresses the amino acid residue chosen from the group which consists (式中、X↑2 は Ser および of Ser and Ala, x↑3 expresses the amino acid Ala よりなる群から選ばれるア residue chosen from the group which consists ミノ酸残基を表し、X↑3 は of Ser and Pro, x↑4 expresses the amino acid Ser および Pro よりなる群から residue chosen from the group which consists of Ala and Asp,  $x \uparrow 1$  and  $X \uparrow 5$  express the peptide fragment which consists of a 1-5 amino なる群から選ばれるアミノ酸残 acid residue chosen from the group which of single bond or Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Ser、 ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) Nle It is attained by providing the peptide or its salt

#### [0006]

本明細書においては各種アミノ 酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基 Arg: L-アルギニン残基 Asn: L-アスパラギン残基 Asp:L-アスパラギン酸残基 Asp

Cys: Lーシステイン残基 Gln: L-グルタミン残基 Glu: Lーグルタミン酸残基

Gly : グリシン残基 His: L-ヒスチジン残基

#### [0006]

Glu

In this specification, the following symbol describes various amino acid residues.

Ala :L- alanine residue Arg :L- arginine residue Asn :L- asparagine residue :L- aspartic-acid residue Cys :L- cystein residue Gln :L- glutamine residue

:L- glutamic acid residue

Gly : glycine residue His :L- histidine residue



lle: L-イソロイシン残基 lle :L- isoleucine residue Leu: L-ロイシン残基 Leu :L- leucine residue Lys : L-リシン残基 Lys :L- lysine residue

Phe:L-フェニルアラニン残 Phe :L- phenylalanine residue

基 Pro :L- proline residue Pro : Lープロリン残基 Ser :L- serine residue Ser: L-セリン残基 Thr :L- threonine residue Thr: Lートレオニン残基 Trp : L-tryptophan residue Trp : Lートリプトファン残基 Tyr :L- tyrosine residue Tyr : Lーチロシン残基 Val :L- valine residue

Val: L-バリン残基 Nle :L- norleucine residue

Nle : Lーノルロイシン残基 Moreover, in this specification, the amino acid また、本明細書においては、常 residue of the N terminal is positioned in 法に従ってペプチドのアミノ酸 left-hand side in the amino acid sequence of a 配列を、そのN末端のアミノ酸 peptide according to a conventional method, the 残基が左側に位置し、C末端の amino acid residue of a C terminal describes アミノ酸残基が右側に位置する that it is positioned in right-hand side. ように記述する。

# [0007]

上記一般式(I)で示されるペ Following-general-formula プチドのうち、下記一般式(I I)

 $H - X \uparrow 6 - A - X \uparrow 7 - Y$   $H - X \uparrow 6 - A - X \uparrow 7 - Y$ (II)

Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln number: 2) Asp Leu Glu (配列番号: 2) 式(3): Ala Ser Pro Cys Cys

#### [0007]

(II)among peptides shown with above-mentioned general formula (I)

(II)

(In the Formula, A is a peptide fragment shown (式中、Aは式(1):Ala Ala Pro by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): Glu (配列番号: 1)で示され The peptide fragment shown by Ala Ser Pro るペプチド断片、式 (2): Ala Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (sequence

Or Formula (3): The peptide fragment shown by で示されるペプチド断片または Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3)

Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列 These are expressed, x ↑ 6 and X ↑ 7 express 番号:3) で示されるペプチド the peptide fragment which consists of a 1-5 断片を表し、X↑6 およびX↑ amino acid residue chosen from the group



7 はそれぞれ単結合または which consists Gly、 Ala、 Val、 Arg、 Asn、 Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、 Asp、Lys、Thr、His、 Tyr, Nle および lle よりなる群から 選ばれる1~5個のアミノ酸残 基からなるペプチド断片を表 し、Yは水酸基またはアミノ基 を表す)で示されるペプチドが 好ましい。

of а single bond or Gly, Ala, Vai, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, L ys, Thr, His, Tyr, NIe, and IIe, respectively, v expresses a hydroxyl group or an amino group.) The peptide shown above is desirable.

# [0008]

ドの代表例を次に示す。

Ala Leu Glu (配列番号: 4)、 Pro lie Val (配列番号:5)、 Asp Leu Glu (配列番号: 6)、 Leu Pro lle Val(配列番号: 7)、 Leu (配列番号:8) および 式(9):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln

Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile

Leu (配列番号: 9)。

# [8000]

本発明により提供されるペプチ The representative example of the peptide which this invention provides is shown next.

式(4):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val 式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp 式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula 式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr lle Leu (sequence number: 8)

式(8):Asn Pro Gly Ala Ser Ala And formula (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Pro Ile Leu (sequence number: 9).

[0009]

[0009]



塩;ナトリウム、カリウム、カ example.; アルカリ金属またはアルカリ土 potassium, calcium, ンジルアミン、ジエタノールア diethanolamine, ミン、 t ーブチルアミン、ジシ dicyclohexylamine, クロヘキシルアミン、アルギニ ンなどとの塩などが挙げられ る。

本発明のペプチドの塩は生理学 The salt of the peptide of this invention is a salt 的に許容される塩であり、その which it accepts physiologically.

塩としては、例えば、塩酸、硫 As its salt, it is a salt with acids, such as the 酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレ hydrochloric acid, a sulfuric acid, a phosphoric イン酸、フマール酸、シュウ酸、 acid, lactic acid, tartaric acid, a maleic acid, a リンゴ酸、クエン酸、オレイン fumaric acid, an oxalic acid, malic acid, a citric 酸、パルミチン酸などの酸との acid, an oleic acid, and a palmitic acid, for

ルシウム、アルミニウムなどの The hydroxide of alkali metals, such as sodium, and aluminium, 類金属の水酸化物または炭酸塩 alkaline-earth metal, or salt with the carbonate; との塩;トリエチルアミン、ベ A salt with a triethylamine, a benzylamine, a а tert butylamine, а the arginine, etc. is mentioned.

# [0010]

の合成において通常用いられる 方法、例えば固相合成法または が、固相合成法が操作上簡便で 「続生化学実験講座2 タンパ ク質の化学(下)」、第 641-694 会社東京化学同人発行)参照)。

### [0010]

本発明のペプチドは、ペプチド The peptide of this invention is prepared by the procedure usually used in a synthesis of a peptide, for example, a solid-phase synthesis 液相合成法によって調製される method, and the liquid-phase synthesis method. However, a solid-phase synthesis method ある(例えば、日本生化学会編 simply on operation comes out, and there is (for example, refer to the Japanese Biochemical Society edition "chemistry (below) of the sequal 頁(昭和62年5月20日 株式 and biochemistry experiment seminar protein", and Page 641-694 (May 20, Showa 62 K.K. Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. issue)).

#### [0011]

などの反応溶媒に不溶性である solvent,

#### [0011]

本発明のペプチドの固相合成法 The manufacture by the solid-phase synthesis による調製は、例えば、スチレ method of the peptide of this invention is ンージビニルベンゼン共重合体 combined with a polymer insoluble in reaction such as for example,



重合体に目的とするペプチドの C末端に対応するアミノ酸をそ れが有する $\alpha$  - COOH基を介 して結合させ、次いで該アミノ 酸に目的とするペプチドのN末 端の方向に向かって、対応する アミノ酸またはペプチド断片を 該アミノ酸またはペプチド断片 が有するα-COOH基以外の 護したうえで縮合させて結合さ せる操作と、該結合したアミノ 酸またはペプチド断片における  $\alpha$  -アミノ基などのペプチド結 合を形成するアミノ基が有する 繰り返すことによってペプチド 鎖を伸長させ、目的とするペプ チドに対応するペプチド鎖を形 成し、次いで該ペプチド鎖を重 合体から脱離させ、かつ保護さ れている官能基から保護基を除 去することにより目的とするペ プチドを得、次いでこれを精製 することによって実施される。 ここで、ペプチド鎖の重合体か らの脱離および保護基の除去 は、フッ化水素を用いて同時に 行うのが副反応を抑制する観点 から好ましい。また、得られた ペプチドの精製は逆相液体クロ マトグラフィーで行うのが効果 的である。

[0012]

また、本発明のペプチドの塩は、

styrene-divinylbenzene copolymer, through the (alpha)-COOH group on which it has an amino acid corresponding to the C terminal of the peptide made into the objective.

酸に目的とするペプチドのN末 Subsequently, the operation which it is made to 端の方向に向かって、対応する condense after protecting functional groups, T に対応する condense after protecting functional groups, such as (alpha)- amino groups other than the 該アミノ酸またはペプチド断片 (alpha)-COOH group on which this amino acid or  $\alpha$  - T に T を peptide fragment has the amino acid or peptide fragment which goes and corresponds to this amino acid in the direction of T terminal of the peptide made into the objective, and is combined, a peptide chain is expanded by repeating in order operation of removing the protecting group which the amino group which forms a peptide bond of the (alpha)- amino group in this united amino acid or united peptide fragment etc. has.

The peptide chain corresponding to the target peptide is formed, subsequently, this peptide chain is desorbed from a polymer.

And the target peptide is obtained by removing a protecting group from the functional group protected, subsequently, it implements by purifying this.

Here, it is desirable to perform simultaneously elimination of the desorption and the protecting group from the polymer of a peptide chain using hydrogen fluoride from a viewpoint which suppresses a side reaction.

Moreover, it is effective to perform purification of the obtained peptide by the reversed phase liquid chromatography.

#### [0012]

Moreover, the salt of the peptide of this



とにより調製される。

通常の塩生成反応を利用するこ invention is prepared by utilizing normal salt generation reaction.

#### [0013]

おいて低毒性であることが確認

#### [0014]

されている。

どの治療に有用である。また、 本発明のペプチド類は、臓器移 植後の拒絶反応を効果的に抑制 する。

#### [0015]

本発明のペプチド類は、骨折、 性関節症、骨粗鬆症、歯周病、 多発性硬化症などの患者に投与 することにより、上記罹患者の 症状を軽減することができる。

#### [0016]

ための投与量は、疾病、患者の どにより異なるが、通常成人1 medicine, etc.

#### [0013]

後述の試験例から明らかなとお The peptide of this invention and its salt (these り、本発明のペプチドおよびそ are hereafter called peptides roughly) have a の塩(以下、これらをペプチド TGF-(beta-) like activity a passage clear from 類と略称する)は、TGFー $\beta$  the below-mentioned EXPERIMENT, and the 様活性を有し、かつ毒性試験に low toxic thing is confirmed in the toxic examination.

#### [0014]

以上の結果から、本発明のペプ The peptides of the above result to this チド類は骨折、創傷、リウマチ invention are useful for the treatment of 性関節炎、変形性関節症、骨粗 fracture, a wound, a rheumatic arthritis, 鬆症、歯周病、多発性硬化症な osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc.

> Moreover, the peptides of this invention suppress the rejection after an organ transplant effectively.

#### [0015]

The peptides of this invention can lighten the 創傷、リウマチ性関節炎、変形 above-mentioned disease person's symptom by administering to patients, such as fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, and multiple sclerosis.

#### [0016]

ペプチド類の有効な活性発現の The dosage for an effective active expression of peptides changes with the illness, a patient's 重篤度、薬物に対する忍容性な seriousness, tolerances with respect to a

日当たり、0.01  $\mu$  g /kg $\sim$  However, they are normal adult 1 sunny and



2 g/kg であり、好ましくは 0.01 microgram/kg - 2 g/kg. /kg である。

0.  $0.1 \mu \text{ g/kg} \sim 2.0 \text{ 0 mg}$  Preferably it is 0.01 microgram(s)/kg - 200

mg/kg.

### [0017]

ましく、また該溶液は薬理学的 に許容される種々の添加剤を含 additive んでいてもよい。

#### [0017]

投与形態としてはペプチド類を The solution obtained by dissolving peptides in 5%ブドウ糖液や生理食塩水な solutions which can accept physiologically, such どの生理学的に許容し得る溶液 as 5-% glucose liquid and physiological saline, に溶解させて得られる溶液が好 as an administration form is desirable, moreover, this solution may contain the various agent which it accepts pharmacologically.

#### [0018]

下投与、腹腔投与、関節内投与、 経皮投与などが挙げられ、さら an はリポソーム化することにより 経口投与も可能である。

#### [0018]

投与方法としては静脈投与、皮 As the administration procedure, an intravenous administration, a subcutaneous administration, abdominal-cavity administration, にペプチド類をカプセル化また administration in a joint, a percutaneous administration, etc. are mentioned. administration can also further do peptides capsulation or by liposome-izing.

[0019]

[0019]

#### 【実施例】

体的に説明する。なお、本発明 invention concretely. れるものではない。

#### [EXAMPLES]

以下、実施例により本発明を具 Hereafter, an Example demonstrates this

はこれらの実施例により限定さ In addition, this invention is not limited by these Examples.

#### [0020]

#### 実施例1

Ala LeuGlu (配列番号: 4)で LeuGlu

#### [0020]

#### Example 1

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Formula (4): The peptide shown by Asn Pro Gly Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala (sequence number: 4) was



により合成した。すなわち、4 - [N- (t-ブトキシカルボ ニルアセトアミドメチル基を 0. 70ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ システムズ社製、PAMグルタ ミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl) ] 0. ド・バイオシステムズ社製のN ル)ーLーグルタミン(t-Boc グ [t-Boc ロイシン]、N-(t- cystein ロリン [t-Boc プロリン]、N-andLーグリシン〔t-Boc グリシ respectively. ン]、N-(t-ブトキシカルボ ニル) - L - アスパラギン [t-Boc アスパラギン]、N-(t-ブトキシカルボニル)-OーベンジルーLーセリン (t-Boc セリン)、N-(tーブ トキシカルボニル) -S- (p

示されるペプチドをペプチド自 compounded by the solid-phase synthesis 動合成装置を用いて固相合成法 method using the peptide automatic-synthesis apparatus.

That is, 0.1 millimoles of the grain-shape resin ニル) - γ - ベンジルー L - グ (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic ルタミルオキシメチル〕 - フェ acid, t-Boc-L-Glu (OBzl)) which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which it has at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/a are used. -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)benzyl-ル比:99対1〕からなる粒状 glutamyl oxy methyl)- The amino acid was 樹脂〔米国アプライド・バイオ combined for the phenyl acetamide methyl group in order toward N edge of a peptide. For joint reaction, as an amino acid, the N 1 1ミリモルを用い、ペプチドの (alpha)-(t-butoxycarbonyl)-L- glutamine by USA N端に向かって順次アミノ酸を Applied Biosystems (t-Boc glutamine), a

結合させた。結合反応において、 N-(t-butoxycarbonyl)-L- leucine (t-Boc leucine), アミノ酸として、米国アプライ a N-(t-butoxycarbonyl)-L- proline (t-Boc proline), N-(t-butoxycarbonyl)-Lglycine  $\uparrow \alpha$  — (tーブトキシカルボニ glycine), N-(t-butoxycarbonyl)-L- asparagine (t-Boc asparagine), N-(t-butoxycarbonyl)-O-ルタミン]、N-(t-ブトキシ benzyl- L- serine (t-Boc serine), カルボニル) - L - ロイシン N-(t-butoxycarbonyl)-S-(p- methoxy benzyl)-L-(t-Boc cystein), ブトキシカルボニル) - L - プ N-(t-butoxycarbonyl)-L- valine (t-Boc valine), 1 millimole (t-Boc alanine) (tーブトキシカルボニル) - N-(t-butoxycarbonyl)-L- alanines were used,



-メトキシベンジル) -L-シ ステイン〔t-Boc システイン〕、 N-(t-ブトキシカルボニル) ーレーバリン〔t-Boc バリン〕、 N-(t-ブトキシカルボニル) ーLーアラニン〔t-Boc アラニ ン〕をそれぞれ1ミリモル用い た。

#### [0021]

相からの脱離を行った。粗生成 about the obtained peptide. マススペクトルにより求めた精 1527.72). 製ペプチドの分子量は1527 であった(理論値:1527. 72)

#### [0021]

得られたペプチドについて株式 The desorption from de-protection and a 会社ペプチド研究所製のHF反 solid-phase was performed using the HF 応装置 I 型を用いて脱保護と固 reactor I type by Peptide Institute. Inc., K.K.,

物をミリポア・ウォーターズ社 The crude product was purified by 製分取用高速液体クロマトグラ high-speed liquid chromatograph for the フ〔カラム:デルタパックC1 aliquoting made from the Millipore \* Waters Inc. 8 4 7  $\times$  3 0 0 mm  $\mathcal{I} \mathcal{V} \mathcal{V} \mathcal{I}$  (column: with a delta pack C18 47\*300 mm prep パック1000加圧モジュール pack 1000 pressurization module).

付〕で精製した。得られた精製 About the obtained purification peptide, it is a ペプチドを島津製作所株式会社 high-speed liquid chromatograph for the LC6AA 製LC6A分析用高速液体クロ analysis by Shimadzu K.K. (column:attaching マトグラフ〔カラム:東ソー株 to Tosoh Corp. TSKgel ODS-80TM CTR CTR). 式会社製TSKgel ODS Mobile phase: The single peak was shown by -80TM CTR、移動相: 18.8min when the trifluoroacetic acid was トリフルオロ酢酸を 0.05 容 attached to the mixed solvent (acetonitrile 量%含有するアセトニトリルと density was changed from 5 volume % to 50 水の混合溶媒(アセトニトリル volume % in 30 minutes) of the acetonitrile 濃度を30分間で5容量%から which contains 0.05 volume %, and water.

5 0 容量%に変化させた)]に付 The molecular weight of the purification peptide したところ、1 8.8 min に単一 for which it required by the FAB method mass のピークが示された。FAB法 spectrum was 1527 (theoretical



#### [0022]

実施例2~6および比較例1 Pro lleVal (配列番号:5)で 示されるペプチド(実施例2)、 Asp Leu Glu (配列番号: 6) Pro lle Leu (配列番号:9)で 示されるペプチド(実施例6)、 および式(10): Gly Pro Cys Pro Tyr lle Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号:10) で示されるペプチド(比較例1) を実施例1と同様の方法により 合成した。

#### [0023]

#### [0022]

Example 2-6 and Comparative Example 1 式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Formula (5): Peptide (Example 2) shown by Ala Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro IleVal (sequence number: 5), formula (6): Peptide (Example 3) shown by Ala Pro Glu 式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Peptide (Example 4) shown by Ala Ser Pro Cys で示されるペプチド(実施例 Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro lle Val 3)、式(7): Ala Ser Pro Cys (sequence number: 7), formula (8): Peptide Cys Val Pro GinAsp Leu Glu (Example 5) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Pro Leu Pro Ile Val (配列番 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro 号:7)で示されるペプチド(実 Leu Thr lle Leu (sequence number: 8), formula 施例 4 )、式(8): Asn Pro Gly (9): Peptide (Example 6) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro AspLeu Glu Pro Leu Pro lie Leu (sequence Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) number: 9), and formula (10): Peptide で示されるペプチド(実施例 (Comparative Example 1) shown by Gly Pro 5)、式(9): Asn Pro Gly Ala Cys Pro Tyr lle Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val was compounded by the procedure similar to Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu Example 1 (sequence number: 10).

#### [0023]

実施例2および実施例4では4 In Example 2 and Example 4, it is 4. ー〔Nー(tーブトキシカルボ -(N-(t-butoxycarbonyl)-L- valyl oxy methyl)- 0.1 ニル) ーLーバリルオキシメチ millimoles (USA Applied Biosystems make,



チル基を 0.68ミリモル/g の構成モル比: 99対1]から なる粒状樹脂〔米国アプライ ド・バイオシステムズ社製、P AMバリン、t-Boc-L-Val ) 0. は4-「N-(t-ブトキシカ ルボニル) - γ - ベンジルー L ーグルタミルオキシメチル]ー フェニルアセトアミドメチル基 を0.70ミリモル/g(樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ ル比: 9 9 対 1〕 からなる粒状 樹脂〔米国アプライド・バイオ システムズ社製、PAMグルタ ミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl) 〕0. 1ミリモルを用い、実施例5及 び実施例6では4-〔N-(t ーブトキシカルボニル)ーLー ロイシルオキシメチル〕-フェ ニルアセトアミドメチル基を 0.68ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレンージビ ニルベンゼン共重合体〔スチレ ンとジビニルベンゼンの構成モ 樹脂〔米国アプライド・バイオ システムズ社製、PAMロイシ ン、t-Boc-L-Leu 〕 0. 1ミリ モルを用い、比較例1では4-

ル] ーフェニルアセトアミドメ PAM valine, t-Boc-L-Val) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene (樹脂) の割合で有するスチレ copolymer (composition molar ratio of styrene ンージビニルベンゼン共重合体 and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl [スチレンとジビニルベンゼン acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Example 3, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)- benzyl- Lglutamyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, 1ミリモルを用い、実施例3で t-Boc-L-Glu (OBzl)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, in Example 5 and Example 6, it is 4. -(N-(t-butoxycarbony!)-Lleucyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, a PAM leucine, t-Boc-L-Leu) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Comparative Example it 1, -(N-(t-butoxycarbonyl)-O- benzyl- L- seril oxy methyl)-0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM serine, t-Boc-L-Ser (BzI)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group ル比:99対1〕からなる粒状 at a ratio of 0.72 millimoles (resin)/g were used.



「N-(tーブトキシカルボニ ル) -O-ベンジル-L-セリ ルオキシメチル〕-フェニルア セトアミドメチル基を0.72 ミリモル/g (樹脂)の割合で 有するスチレンージビニルベン ゼン共重合体〔スチレンとジビ ニルベンゼンの構成モル比:9 9対1〕からなる粒状樹脂〔米 国アプライド・バイオシステム ズ社製、PAMセリン、 t-Boc-L-Ser(Bzl)) 0. 1ミリモ ルを用いた。

#### [0024]

例1で用いたものに加えて米国 Example ボニル) -O-(2-ブロモベ Biosystemsンジルオキシカルボニル) - L N-(t-butoxycarbonyl)-L-ーチロシン [t-Boc チロシン]、 isoleucine), ソロイシン]、N-(t-ブトキ acid ルタミン酸]、N-(t-ブトキ シカルボニル) - β - ベンジル - L-アスパラギン酸〔t-Boc アスパラギン酸]、N↑α-(t ーブトキシカルボニル) - NInd ーホルミルーLートリプトファ ン〔t-Boc トリプトファン〕を 用いた。

# [0024]

また、アミノ酸としては、実施 As an amino acid, it adds to what was used in Moreover, the 1. アプライド・バイオシステムズ N-(t-butoxycarbonyl)-O-(2-bromo 社製のN- (tーブトキシカル benzyloxycarbonyl)-L- tyrosine by USA Applied tyrosine), the (t-Boc isoleucine (t-Boc n-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)-N-(t-ブトキシカルボニル) benzyl- L- glutamic acid (t-Boc glutamic acid), - L - イソロイシン [t-Boc イ N-(t-butoxycarbonyl)-(beta)- benzyl- L- aspartic (t-Boc aspartic acid). 1 シカルボニル) ー γ ーベンジル (alpha)-(t-butoxycarbonyl)-NInd-formyl-- L − グルタミン酸〔t-Boc グ L-tryptophan (t-Boc tryptophan) were used.



[0025]

得られたそれぞれのペプチドに ついて実施例1におけると同様 にして脱保護と固相からの脱離 を行い、粗生成物を精製した。 それぞれの精製ペプチドについ て、分析用高速液体クロマトグ ラフにおける溶出時間およびF AB法マススペクトルによる分 て示す。

[0025]

In Example 1, the desorption from de-protection and a solid-phase was similarly performed about each obtained peptide, and the crude product was purified.

About each purification peptide, the elution time in the high-speed liquid chromatograph for an and analysis determination-of-molecular-weight result by the 子量測定結果を第1表にまとめ FAB method mass spectrum are summarized in Table 1, and are shown.

[0026]

[0026]

【表1】

[TABLE 1]

第 ŀ 表

実施例	溶出時間	精製ペプチド		(理論値)
または 比較例	(min)	式番号	分子量	(左侧型)
実施例2	23.9	(5)	1620	1620.97
実施例3	18.0	(6)	1658	1659.79
実施例 4	23.8	(7)	1680	1680.98
実施例 5	25.5	(8)	2112	2 1 1 5 . 3 8
実施例6	25.0	(9)	2111	2111.39
比較例1	2.3.4	(10)	1631	1629.78

First Table

Example or Comparative Example; Elution time; Purification Peptide (Formula number; Molecular weight); (Theoretical value)



Example 2

Comparative Example 1

[0027]

試験例1

臓細胞の増殖抑制試験

を、コンカナバリンA:3μg/ml、2ーメルカプトエタノー A-concanavalin-A:3 ル:50μΜ、牛胎児血清:1 3%の割合でそれぞれ含有する し、5000個/ウエルの割合 で 9 6 ウエルプレートに分注 days at 37 degrees C in presence. し、7%CO↓2 存在下37℃ で7日間培養した。培養後プロ ピディウムアイオダイドで生細 胞のDNAを標識し、蛍光強度 を測定することにより生細胞数 をカウントした。ペプチドは1  $0.0 \mu g/ml$ ,  $TGF-\beta ld 1$ ng/ml の濃度になるようにそ れぞれコンカナバリンA刺激直 前に添加した。コンカナバリン Aを加えないウエルに対するコ ンカナバリンAのみを加えたウ て、ペプチドまたはTGF - βを加えた時の生細胞数の減少を rate. 抑制率として表した。結果を第 A result is shown in Table 2. 2表に示す。

[0027]

Experiment 1

コンカナバリンA刺激マウス脾 The growth-inhibition examination of the A-concanavalin-A irritation mouse spleen cell BALB/cマウス脾臓細胞 The BALB/c-mouse spleen cell is dispersed to contains which RPMI-1640 medium microgram/ml, 2-mercaptoethanol:50 micronM. and foetal-bovine-serum:13% ratio, respectively, it RPMI-1640培地に分散 dispenses on 96 well plate at a ratio of 5000 piece / well, 7% CO ↓ 2 -- it cultivated for seven

> DNA of a living cell is labeled with propidium iodide after cultivating, the living cell number was counted by measuring a fluorescence intensity.

> The peptide added 100 microgram(s)/ml and TGF- (beta-) just before the A-concanavalin-A irritation, respectively so that it might become the density of 1 ng/ml.

The increase in the living cell number of the well which added only the A concanavalin A with respect to the well which does not add the A concanavalin A is set to 1, the reduction of the エルの生細胞数の増加を1とし living cell number when adding a peptide or TGF- (beta-) was expressed as a suppression

[0028]

[0028]



【表2】

#### [TABLE 2]

#### 第 2 表

実施例または 比較例	ペプチド	抑制率(%)
_	T G F - β	8 5
実施例 1	式 (4) で表されるペプチド	6 0
実施例2	式 (5) で表されるペプチド	7 0
実施例3	式(6)で表されるペプチド	6 5
実施例 4	式(7)で表されるペプチド	7 3
実施例 5	式 (8) で表されるペプチド	7 0
実施例6	式 (9) で表されるペプチド	7 2
比較例 1	式 (10) で表されるペプチド	2

#### Second Table

Example or Comparative Example; Peptide; Suppression rate

Example 1; Peptide expressed with formula (4)

Comparative Example 1; ...

#### [0029]

# [0029]

れたペプチドの抑制率は60% Example 6 is 60% - 73%.

第2表のとおり、 $TGF-\beta \mathcal{O}$  As opposed to the suppression rate of TGF-抑制率が85%であるのに対し (beta-) being 85% as Table 2, the suppression て、実施例1~実施例6で得ら rate of the peptide obtained in Example 1-

~73%であり、本発明のペプ It is clear that the peptide of this invention



チドがTGF-β様の活性を示 shows TGF-(beta) -like activity. すことは明らかである。

[0030]

試験例2

軟寒天中のコロニー形成試験 2.5 ng/ml ØEGF, 10% 天を含むイーグルのMEM培地 にNRK-49F細胞を100 0個/シャーレの割合で直径1 0 cm のシャーレに撒き、7% CO↓2 存在下37℃で7日間 C. で生細胞を染色し、コロニー1 00個あたりの70μm以上の 直径を有するコロニーの割合を searched for. れ、何も添加しないコントロー ルの平均33%と比較して有意 にコロニー形成が促進された。

[0031]

#### 【発明の効果】

性関節症、骨粗鬆症、歯周病な osteoarthritis, どの治療に有効であり、また臓 disease, etc. 抑制することができる。

[0030]

Experiment 2

The colony formation examination in soft agar NRK-49F cell is scattered at a ratio of 1000 の牛胎児血清及び 0.5%の寒 piece / Petri dish at a Petri dish with a diameter of 10 cm to the MEM medium of the eagle containing 2.5-ng/ml EGF, 10% of foetal bovine serum, and 0.5% of agar, in presence of 7% CO ↓ 2. it cultivated for seven days at 37 degrees

培養した。ニュートラルレッド A living cell is colored by the neutral red, the ratio of a colony of having the diameter of 70 micromerter or more per 100 colonies was

求めた。その結果、実施例1で Consequently, when the peptide obtained in 得られたペプチドを $300\mu$ g Example 1 is added by 300 microgram(s)/ml /ml の濃度で添加したときに density, an average of 58% of colony is formed, 平均 5 8 %のコロニーが形成さ compared with an average of 33% of the control which nothing adds, colony formation was promoted significantly.

[0031]

#### [ADVANTAGE of the Invention]

本発明により提供されるペプチ The peptides which this invention provides are ド類は、骨折、創傷、多発性硬 effective in the treatment of fracture, a wound, 化症、リウマチ性関節炎、変形 multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoporosis, а periodontal

器移植後の拒絶反応を効果的に Moreover, the rejection after an organ transplant can be suppressed effectively.



[0032]

[0032]

【配列表】

[SEQUENCE TABLE]

配列番号:1

Sequence number: 1

配列の長さ:11

Sequence length: 11

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gin Ala Leu Giu

l

•

10

Sequence

[0033]

[0033]

配列番号:2

Sequence number: 2

配列の長さ:11

Sequence length: 11

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gin Asp Leu Giu

1

5

10

Sequence

[0034]

[0034]

配列番号:3

Sequence number: 3

配列の長さ:11

Sequence length: 11

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide



配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

5

10

Sequence

[0035]

配列番号:4

配列の長さ:16

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Pro Gln Ala Leu Glu

Glu

1 10

15

15

[0036]

配列番号:5

配列の長さ:16

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro lle Pro Leu Pro lle Val

Val 1

10

[0037]

配列番号:6

配列の長さ:16

[0035]

Sequence number: 4

Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

1

5 15

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val

5

10

[0036]

Sequence number: 5 Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

5

10

[0037]

1

5 15

Sequence number: 6

Sequence length: 16



配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Pro Gln Asp Leu Glu

Glu

1

5

10

1

5 15

10

15

[0038]

[0038]

配列番号:7

Sequence number: 7

配列の長さ:16

Sequence length: 16

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu

5

Gin Asp Leu Glu Pro Leu Pro Pro Leu Pro Ile Val

lle Val 1

15

5

10

15

[0039]

[0039]

配列番号:8

Sequence number: 8

配列の長さ:21

Sequence length: 21

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

5

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu

Glu

1

10

10

1

5 15

10

15

Pro Leu Thr Ile Leu

Pro Leu Thr lle Leu

20



20

[0040]

[0040]

配列番号:9

Sequence number: 9

配列の長さ:21

Sequence length: 21

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

5

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu

Glu

1

1

5 15

10

15 Pro Leu Pro lle Leu

Pro Leu Pro lle Leu

20

20

[0041]

[0041]

配列番号:10

Sequence number: 10

配列の長さ:14

Sequence length: 14

配列の型:アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー:直鎖状

Topology: Linear

配列の種類:ペプチド

Type of sequence: Peptide

配列

Sequence

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln

Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

Tyr Ser

1

5 1

5

10

10

10



#### **DERWENT TERMS AND CONDITIONS**

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

"WWW.DERWENT.CO.UK" (English)
"WWW.DERWENT.CO.JP" (Japanese)